



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO NO CÃO ONCOLÓGICO: ESTUDO NO HOSPITAL
ESCOLAR DA FMV - UTL

ANA MARIA PAULO DA SILVA FÉLIX

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professora Doutora Maria Manuela
Grave Rodeia Espada Niza

Professor Doutor Jorge Manuel de
Jesus Correia

Professora Doutora Maria Constança
Matias Ferreira Pomba

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADORA

Professora Doutora Maria Constança
Matias Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO NO CÃO ONCOLÓGICO: ESTUDO NO HOSPITAL
ESCOLAR DA FMV - UTL

ANA MARIA PAULO DA SILVA FÉLIX

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professora Doutora Maria Manuela
Grave Rodeia Espada Niza

Professor Doutor Jorge Manuel de
Jesus Correia

Professora Doutora Maria Constança
Matias Ferreira Pomba

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADORA

Professora Doutora Maria Constança

Matias Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2010

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba, por todo o apoio e dedicação durante a execução desta dissertação, pela boa-disposição e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao meu co-orientador, Dr. Gonçalo Vicente, por tudo o que me ensinou e pela ajuda e amizade ao longo de todo o meu estágio e aquando da realização desta dissertação.

À Dra. Felisbela Loução, pela sua grande ajuda na realização deste estudo.

Ao Dr. Sérgio Pereira pela disponibilidade, paciência e ajuda prestada na realização das urianálises.

A todos os médicos, auxiliares, recepcionistas e estagiários do Hospital Escolar da FMV-UTL por todo o apoio e amizade, e por terem tornado o meu estágio numa óptima experiência, que além de me oferecer novas amizades, me deu a oportunidade de crescer como pessoa e futura profissional.

A todos os médicos e enfermeiras do Barton Veterinary Hospital que tão bem me receberam e tanto me ensinaram.

Aos meus pais, porque sem eles nada seria possível... Obrigado por todo o amor, paciência, ajuda e apoio incondicionais ao longo de toda a minha vida e por me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos e a tornar os meus sonhos realidade.

Ao meu irmão e à minha cunhada, pela amizade, pelas experiências que proporcionaram e por me terem “aturado” em tanta coisa.

À Caty um especial obrigado, por se ter tornado numa amiga tão especial... por me ter apoiado em todos os momentos, e por tantas aventuras partilharmos.

À Alex e à Joana que me surpreenderam e ganharam também um lugar no meu coração. Que tanto me fizeram rir e tantas coisas partilhámos.

À Catarina, à Márcia e à Joantina pela amizade que se formou e por todos os bons momentos que passámos juntas.

A todas as pessoas com quem me cruzei nesta jornada e que de alguma forma me ajudaram a crescer.

E não podia deixar de ser... à minha Gin. Que me acompanhou durante todo este percurso, fez companhia em todos os momentos que para ela eram sempre de alegria e nunca deixou de ser doida.

RESUMO - INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO NO CÃO ONCOLÓGICO: ESTUDO NO HOSPITAL ESCOLAR DA FMV - UTL

O desenvolvimento de infecção do tracto urinário (ITU) depende fundamentalmente de uma resposta ineficaz por parte do hospedeiro. Está descrito que a doença oncológica causa alterações imunitárias, e as células afectadas estão também envolvidas na resposta à ITU.

Este estudo teve, assim, como objectivo avaliar a presença de ITU nos doentes oncológicos (sujeitos ou não a protocolos de quimioterapia).

Para a investigação clínica foram definidos dois estudos: o Estudo 1, realizado no Hospital Escolar da FMV – UTL entre 15 de Janeiro de 2010 e 30 de Abril de 2010; e o Estudo 2 que envolveu a análise de casos entre 2003 e o início de 2010.

No estudo 1 foram definidos 3 grupos: ON₁ - canídeos saudáveis ($n=25$); OS₁ - doentes oncológicos não submetidos a quimioterapia ($n=12$); OT₁ - doentes oncológicos submetidos a quimioterapia ($n=6$). Foram efectuadas urianálise tipo II e urocultura nos grupos ON₁, OS₁ e OT₁. O diagnóstico definitivo do tipo de neoplasia foi realizado por citologia após punção aspirativa por agulha fina ou análise histopatológica de peça cirúrgica após exérese. No estudo 2 foram incluídos 102 canídeos com doença oncológica (grupo OT₂, $n=13$; grupo OS₂, $n=89$). Os resultados foram analisados estatisticamente (SPSS 2009).

Nos grupos OS₁ e OS₂, as neoplasias mais frequentes foram o carcinoma mamário (OS₁: 17% e OS₂: 34%) e o mastocitoma (OS₁: 17% e OS₂: 18%). Nestes dois grupos, cinco canídeos encontravam-se sob terapia paliativa com prednisolona oral. Nos grupos OT₁ e OT₂, a neoplasia mais frequente foi o mastocitoma (OT₂: 46%) seguida pelo linfoma (OT₂: 31%).

No grupo OS₁ foram encontrados 3 animais com ITU, cada um com isolamento de um agente patogénico diferente (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Stenotrophomonas maltophilia*) numa quantidade superior a 10^5 UFC/ml. Destes isolados, verificou-se que a *E.coli* isolada era multi-resistente e produtora de cefalosporinase, e a estirpe de *S. maltophilia* era também multi-resistente, revelando-se susceptível à combinação Trimetoprim-Sulfametoxazol. Apenas um animal pertencente ao grupo retrospectivo OS₂ apresentou ITU com isolamento de *Staphylococcus pseudintermedius*. Nos grupos ON₁, OT₁ e OT₂ não foi diagnosticada nenhuma ITU. Pela aplicação do Teste Exacto de Fisher não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos OS₁ e OS₂ e OT₁ e OT₂.

No nosso estudo, apenas os doentes oncológicos sujeitos a tratamento paliativo apresentaram ITU. Será necessário avaliar uma população de maior dimensão para determinar se a doença oncológica constitui um factor de risco para o aparecimento de ITU.

Palavras-chave: infecção do tracto urinário, doença oncológica canina, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, resistência antimicrobiana

ABSTRACT – URINARY TRACT INFECTION IN THE ONCOLOGIC DOG: STUDY IN HOSPITAL ESCOLAR DA FMV – UTL

The development of urinary tract infection depends essentially upon an inefficient response by the host. It is described that oncologic disease causes immunity disturbances, and that the affected cells are the same ones involved in the immune response to urinary tract infection.

Thus, this study had the aim of evaluating the presence of urinary tract infection in oncologic patients (subjected or not to chemotherapeutic protocols).

For the clinical investigation, two studies were defined: the Study 1, taken place in Hospital Escolar da FMV – UTL between 15th January 2010 and 30th April 2010; and the Study 2, which involved the analysis of cases between 2003 and the beginning of 2010.

3 groups were defined in Study 1: ON₁ – healthy dogs ($n=25$); OS₁ – oncologic patients not submitted to chemotherapy ($n=12$); OT₁ – oncologic patients submitted to chemotherapy ($n=6$). Urinalysis type II and urine culture were performed in groups ON₁, OS₁ and OT₁. The definitive diagnosis of the type of neoplasia was done by cytology after fine needle aspirate or histopathologic analysis of the surgical piece after resection. In Study 2, 102 dogs with oncologic disease were included (group OT₂, $n=13$; group OS₂, $n=89$). Results were statistically analyzed (SPSS 2009).

In OS₁ and OS₂ groups, the most frequent neoplasias were the mammary carcinoma (OS₁: 17% and OS₂: 34%) and the mast cell tumor (OS₁: 17% e OS₂: 18%). In these groups, five dogs were under palliative therapy with oral prednisolone. In OT₁ and OT₂ groups, the most frequent neoplasia was the mast cell tumour (OT₂: 46%) followed by lymphoma (OT₂: 31%).

In OS₁ group, 3 animals were found with urinary tract infection, each one with a different pathogen isolated (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Stenotrophomonas maltophilia*) in an amount above 10⁵UFC/ml. Of these, it was observed that the isolated *E.coli* was multidrug-resistant and a cephalosporinases producer, and the *S. maltophilia* strain was multidrug-resistant, revealing susceptibility to the Trimetoprim-Sulfametoxazol combination. Only one animal from the OS₂ group showed urinary tract infection with *Staphylococcus pseudintermedius* isolate. In ON₁, OT₁ and OT₂ groups, no urinary tract infection was diagnosed. There was not statistically significantly difference with the use of Fisher Exact Test between OS₁ e OS₂ e OT₁ e OT₂ groups.

In this study, only oncologic patients subjected to palliative treatment showed urinary tract infection. It will be necessary to evaluate a larger population to determine if oncologic disease is a risk factor to the development of urinary tract infection.

Key-words: urinary tract infection, canine oncologic disease, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, antimicrobial resistance

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo - Infecção do Tracto Urinário no Cão Oncológico: Estudo no Hospital Escolar da FMV - UTL	iii
Abstract – Urinary Tract Infection in the Oncologic Dog: Study in Hospital Escolar da FMV – UTL	v
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Índice de Gráficos	xii
Lista de abreviaturas	xiii
I. Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio curricular	1
I.1. Introdução	2
I.1.1. Breve descrição das actividades	2
I.1.1.1. Barton Veterinary Hospital and Surgery	2
I.1.1.2. Hospital Escolar da FMV - UTL	3
II. Introdução: Infecção do Tracto urinário e Doença oncológica em canídeos	5
II.1. Infecção do Tracto Urinário	6
II.1.1. Etiologia e patogénese	7
II.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	9
II.1.1.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11
II.1.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
II.1.1.4. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	14
II.1.2. Mecanismos de defesa	15
II.1.2.1. Mecanismos de defesa anatómicos e fisiológicos	15
II.1.2.2. Mecanismos de defesa imunitários, inatos e adquiridos	18
II.1.3. Sinais clínicos	25
II.1.4. Diagnóstico	26
II.1.4.1. Urianálise	26
II.1.4.2. Urocultura e identificação	27
II.1.4.3. Teste de Susceptibilidade aos Antibióticos (TSA)	28
II.1.5. Resistência bacteriana aos antibióticos	31
II.1.6. Tratamento	36
II.2. Doença oncológica no cão	40
II.2.1. Tumores benignos <i>versus</i> malignos	40
II.2.2. Estadiamento tumoral e estadiamento clínico	42
II.2.3. Neoplasias malignas nos canídeos	44
II.2.3.1. Algumas das neoplasias malignas mais frequentes nos canídeos	45
II.2.4. Síndrome paraneoplásica	50
II.2.4.1. Imunossupressão	51
II.2.5. Quimioterapia em canídeos: alguns dos fármacos mais utilizados e seus efeitos no hospedeiro	59
II.2.5.1. Prednisona	60
II.2.5.2. Doxorrubicina	61
II.2.5.3. Ciclofosfamida	61

II.2.5.4. Vincristina e vimblastina	62
II.2.5.4. Carboplatina e Cisplatina	63
III. Investigação clínica – Infecção do tracto urinário no cão oncológico:	
Estudo no Hospital Escolar da FMV - UTL.....	65
III.1. Objectivos	66
III.2. Materiais e métodos	66
III.2.1. Amostra populacional	66
III.2.1.1. estudo 1	66
III.2.1.2. Estudo 2	67
III.2.1.3. Caracterização epidemiológica da amostra (sexo, idade e raça)	67
• Distribuição sexual	67
• Idade	68
• Raça	68
III.2.2. Recolha das amostras	70
III.2.2.1. Estudo 1	70
III.2.2.2. Estudo 2	70
III.2.3. Urocultura	72
III.2.4. Urinálise	73
III.2.5. Identificação do agente uropatogénico	73
III.2.6. Teste de susceptibilidade aos antibióticos (TSA)	74
III.2.6.1. Método de difusão em disco	74
III.2.6.2. Concentração inibitória mínima (CIM)	77
III.2.6.3. Critérios interpretativos	80
III.2.7. Análise estatística dos resultados	80
III.3. Resultados e discussão	80
III.3.1. Estudo 1 ($n=18$) – ITU no cão oncológico	80
III.3.2. Estudo 2 ($n=102$) – ITU no cão oncológico	92
III.3.3. Infecção do tracto urinário no doente oncológico com e sem quimioterapia ($n=120$)	92
III.3.3.1. Neoplasias no Estudo 1 ($n=18$)	92
III.3.3.2. Neoplasias no Estudo 2 ($n=102$)	93
III.3.3.3. Análise estatística da Infecção do Tracto urinário no cão oncológico com e sem quimioterapia ($n=120$)	95
III.4. Conclusão	97
IV. Bibliografia	99
Anexos	111
Anexo 1 – Casuística referente ao estágio curricular no <i>Barton Veterinary Hospital</i>	112
Anexo 2 – Casuística referente ao estágio curricular no Hospital Escolar da FMV – UTL	115
Anexo 3 – Resultados dos inquéritos epidemiológicos realizados no Estudo 1	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Sequência de fenómenos que levam à formação dos reservatórios intracelulares de UPEC e reinfecção (adaptado de Kau <i>et al.</i> , 2005)	11
Figura 2 – CBIs nas células epiteliais superficiais da bexiga de rato, 6 horas após infecção (adaptado de Rosen <i>et al.</i> , 2008)	14
Figura 3 – Papel da microbiota normal na exclusão de agentes patogénicos, por competição (adaptado de Tizard, 2004)	17
Figura 4 - Apresentação do antígeno no complexo maior de histocompatibilidade classe II na célula apresentadora de antígenos, à célula Th, através do seu receptor (adaptado de Willey <i>et al.</i> , 2008)	23
Figura 5 - Sinais mais frequentes nos animais com infecção do tracto urinário (reproduzido com autorização: Féria, 2001)	25
Figura 6 - Api 20 E, exemplo de painel bioquímico	28
Figura 7 – Esquema de método de difusão em disco (adaptado de Walker, 2006)	30
Figura 8 - Inquérito epidemiológico realizado aos proprietários dos animais do Estudo 1	71
Figura 9 - Inquérito realizado ao proprietário na recepção de cada amostra	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias isoladas de ITUs em canídeos	8
Tabela 2 – Mecanismos locais de defesa (adaptado de Senior, 2006)	15
Tabela 3 – Interpretação dos dados laboratoriais e clínicos para o diagnóstico da ITU no cão (reproduzido com autorização: Pomba, 2004)	28
Tabela 4 – Mecanismos de acção de alguns agentes antimicrobianos (adaptado de Tenover, 2006)	37
Tabela 5 - Características gerais do tecido neoplásico (Powers, 2003)	40
Tabela 6 - Classificação binomial dos tumores (Slauson & Cooper, 2002)	41
Tabela 7 - Comportamento biológico de tumores benignos <i>versus</i> malignos (Slauson & cooper, 2002)	42
Tabela 8 - Parâmetros considerados no sistema TNM (adaptado de Dobson, 2003)	43
Tabela 9 - Diferentes tipos histológicos de tumores mamários malignos (Rutteman & Kirpensteijn, 2003)	45
Tabela 10 – Exemplos de critérios histológicos para determinação do grau do mastocitoma (Murphy, 2003)	47
Tabela 11 - Critérios da OMS para o estadiamento clínico de mastocitoma (Murphy, 2003)	48
Tabela 12 - Protocolo L-CHOP de Wisconsin-Madison (Adaptado de Chun, 2009)	49
Tabela 13 - Sistema de estadiamento clínico de linfoma da OMS nos animais domésticos (Vail, 2003)	50
Tabela 14 - Distribuição etária dos canídeos na altura do diagnóstico da doença oncológica	68
Tabela 15 - Antibióticos utilizados, cargas dos discos e critérios interpretativos (mm) para os halos nos TSAs de <i>Enterobacteriaceae</i>	74
Tabela 16 - Antibióticos utilizados, cargas dos discos e critérios interpretativos (mm) para os halos no TSA de <i>S. maltophilia</i>	76
Tabela 17 - Critérios interpretativos de CIMs para <i>Enterobacteriaceae</i>	77
Tabela 18 – Critérios interpretativos de CIMs para <i>S. maltophilia</i>	79
Tabela 19 - Resultados do TSA pelo método de difusão em disco do Paciente 1	82
Tabela 20 - Resultados do TSA pela determinação da CIM do Paciente 1	83
Tabela 21 - Resultados do TSA pelo método de difusão em disco da Paciente 2	85
Tabela 22 - Resultados do TSA pela determinação da CIM da Paciente 2	86
Tabela 23 - Resultados do TSA pelo método de difusão em disco do Paciente 3	89
Tabela 24 - Resultados do TSA pela determinação da CIM do Paciente 3	89
Tabela 25 – Neoplasias observadas no grupo OS ₁ (n=12)	93
Tabela 26 – Neoplasias observadas no grupo OT ₁ (n=6)	93

Tabela 27 – Distribuição das neoplasias no grupo OS ₂ (n=89)	94
Tabela 28 - Tabela de contingência utilizada no Teste Exacto de Fisher	95
Tabela 29 - Descrição do número de horas de estágio em cada serviço do <i>Barton Veterinary Hospital</i>	112
Tabela 30 – Síntese da casuística referente aos diferentes serviços durante o estágio no <i>Barton Veterinary Hospital</i>	113
Tabela 31 - Descrição do número de horas de estágio em cada serviço do Hospital Escolar da FMV - UTL	115
Tabela 32 - Descrição detalhada da casuística referente ao serviço de Medicina Interna durante o estágio no Hospital Escolar da FMV - UTL	116
Tabela 33 - Casuística das intervenções cirúrgicas observadas durante o estágio realizado no Hospital Escolar da FMV - UTL	118
Tabela 34 - Síntese dos resultados obtidos com os inquéritos epidemiológicos	119

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição sexual dos doentes oncológicos não submetidos a quimioterapia (Grupos OS ₁ e OS ₂ , $n=101$)	68
Gráfico 2 – Distribuição sexual dos cães submetidos a quimioterapia (grupos OT ₁ e OT ₂ , $n=19$)	68
Gráfico 3 - Raças nos grupos OS ₁ e OS ₂ ($n=101$)	69
Gráfico 4 - Raças nos grupos OT ₁ e OT ₂ ($n=19$)	69
Gráfico 5 – Frequência das neoplasias no grupo OS ₂ ($n=89$)	94
Gráfico 6 - Distribuição das neoplasias no grupo OT ₂ ($n=13$)	95
Gráfico 7 - Distribuição relativa das horas dispendidas em cada serviço do <i>Barton Veterinary Hospital</i>	112
Gráfico 8 - Distribuição relativa das horas dispendidas em cada serviço do Hospital Escolar da FMV - UTL	115

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma

µl – microlitro

BID – duas vezes por dia

CASFM – *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*, Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia

CBI – Comunidade bacteriana intracelular

CD – Célula dendrítica

CHOP – C=ciclofosfamida; H=doxorrubicina; O=vincristina; P=prednisona

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm – centímetro

Cnf 1 – *Cytotoxic necrotizing factor 1*, Factor necrosante citotóxico 1

COP – C=ciclofosfamida; O=vincristina; P=prednisona

CTLA-4 – *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*

DNA – *Desoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico

ESBL – *Extended Spectrum β-Lactamases*, β-Lactamase de espectro alargado

G-CSF – *Granulocyte colony stimulating factor*, Factor estimulante de colónias de granulócitos

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor*, Factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos

I – Intermédio

IDO – indolamina-2,3-dioxigenase

IFN-α – Interferão-α

IFN-γ – Interferão-γ

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IL-15 – Interleucina 15

IL-17 – Interleucina 17

ITU – Infecção do tracto urinário

L-CHOP – L=L-asparaginase; C=ciclofosfamida; H=doxorrubicina; O=vincristina; P=prednisona

LPS – Lipopolissacárido

m² – metro quadrado

M-CSF – *Macrophage colony stimulating factor*, Factor estimulante de colónias de macrófagos

mg – miligrama

MHC – *Major Histocompatibility Complex*, Complexo maior de histocompatibilidade

ml – mililitro

mm – milímetro

MRSP – *Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* metilina-resistente

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns*, Padrões moleculares associados a patógenos

PCR – *Polymerase chain reaction*

PGE₂ – Prostaglandina E₂

R – Resistente

RNA – *Ribonucleic acid*, Ácido ribonucleico

S – Sensível

SID – uma vez ao dia

TAC – Tomografia axial computadorizada

Tc – T citotóxico

TGF- β – *Transforming growth factor- β* , Factor transformador de crescimento- β

Th – T *helper*

Th1 – T *helper* 1

Th17 – T *helper* 17

Th2 – T *helper* 2

TID – três vezes ao dia

TLR – Receptor tipo Toll

TLR-4 – Receptor tipo Toll-4

TLR-5 – Receptor tipo Toll-5

TNF- α – *Tumor necrosis factor- α* , Factor de necrose tumoral- α

TNF- β – *Tumor necrosis factor- β* , Factor de necrose tumoral- β

Tr1 – T reguladoras 1

Treg – T reguladoras

TSA – Teste de Susceptibilidade aos Antibióticos

UFC – Unidades formadoras de colônias

UPEC – *Uropathogenic Escherichia coli*, *Escherichia coli* uropatogénica

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*, Factor de crescimento vascular endotelial

I. DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

I.1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular foi realizado no Barton Veterinary Hospital and Surgery, em Canterbury, Reino Unido, ao abrigo do programa Erasmus, de 5 de Outubro de 2009 e 8 de Janeiro de 2010, e posteriormente no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, de 12 de Janeiro de 2010 a 30 de Abril de 2010, sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba e co-orientação do Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente.

Durante este período foram desenvolvidas actividades que tiveram como objectivo a aquisição de conhecimentos e aptidões nas áreas de clínica, cirurgia, imagiologia (e outros meios de diagnóstico) dos animais de companhia.

I.1.1. BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES

I.1.1.1. BARTON VETERINARY HOSPITAL AND SURGERY

O Barton Veterinary Hospital and Surgery situa-se no Reino Unido, na cidade de Canterbury. Este hospital presta serviços com consultas de 1ª opinião nas áreas de medicina interna, dermatologia, oftalmologia, cirurgia e imagiologia de pequenos animais e animais exóticos, e consultas de referência nas áreas de medicina interna, cardiologia, oftalmologia, ortopedia e de hiperadrenocorticismismo felino, onde, por possuir uma unidade de tratamento desta doença com I^{131} , recebia também animais referenciados para esse tratamento. Além destes serviços, o Barton Veterinary Hospital tem também à disposição consultas com enfermeiras veterinárias, onde os donos podem tirar dúvidas relativamente à educação e nutrição dos seus animais, onde são efectuados procedimentos simples como por exemplo corte de unhas e limpeza de feridas, onde são desenhados planos de perda de peso para animais obesos, entre muitas outras actividades. A distribuição das horas dispendidas em cada serviço encontra-se representada no Anexo 1: Tabela 29 e no Gráfico 7.

Durante o meu período de estágio neste local, foi-me permitido participar em quaisquer das actividades desenvolvidas. Desse modo, participei nas actividades desenvolvidas nas unidades de internamento, tanto de cães como de gatos, onde se prestavam cuidados de alimentação e higiene aos doentes internados, eram administradas medicações (por via oral, subcutânea, intramuscular ou endovenosa) consoante as suas necessidades, era realizada a monitorização dos pacientes, e eram realizados diversos procedimentos como colheita de sangue venoso para análises clínicas, venopunção para colocação de cateter e sistema de venoclise, algaliação, cistocentése, etc.

Foi-me permitida a observação das consultas de referência, e na nas consultas de 1ª opinião tive a oportunidade de observar o desenrolar das consultas, onde, por vezes, me foi dada a oportunidade de iniciar consultas nas quais realizava a história clínica e exame físico

de paciente, e de realizar alguns procedimentos simples, como por exemplo, imunização e limpeza de feridas.

Na área da cirurgia, realizava a administração de pré-medicação, a indução da anestesia com propofol e colocação do tubo endotraqueal, ligação ao sistema de anestesia volátil com isoflurano, preparação do paciente com tricotomia e lavagem e desinfecção do campo cirúrgico. Além disso, foi-me permitida a realização de alguns procedimentos cirúrgicos, que incluíram a orquiectomização de cães e gatos e a ovariectomia de cadelas e gatas, e foi-me também permitido a observar e auxiliar na realização de procedimentos mais complexos.

Por fim, na área da imagiologia, o Barton Veterinary Hospital possuía serviço de radiologia, ultrassonografia e endoscopia, em que me foi permitida a execução de exames radiológicos e sua interpretação e a observação e interpretação de exames ecográficos e endoscópicos.

No Anexo 1: Tabela 30 encontra-se uma síntese dos casos observados/tarefas desenvolvidas nestes serviços.

I.1.1.2. HOSPITAL ESCOLAR DA FMV - UTL

O Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, situado no Alto da Ajuda em Lisboa, Portugal, é um hospital que tem por objectivo contribuir para a formação dos estudantes do curso de Medicina Veterinária, proporcionando-lhes contacto e experiência nas diversas actividades desenvolvidas no hospital.

O Hospital Escolar da FMV presta serviços com consultas de 1ª opinião nas áreas de medicina interna, cirurgia e imagiologia (onde são realizados exames radiológicos, ecográficos e tomografia axial computadorizada) e consultas de referência nas áreas da oftalmologia, cardiologia, neurologia, ortopedia, endocrinologia, dermatologia e comportamento animal. Possui também uma unidade de internamento de cães e gatos.

Neste hospital, o estagiário faz turnos de 8 horas nos serviços de Medicina Interna, Imagiologia e Cirurgia, e turnos de 12 ou 24 horas no serviço de Internamento. A distribuição das horas dispendidas em cada serviço encontra-se representada no Anexo 2: Tabela 31 e Gráfico 8.

Na área da Medicina Interna (Anexo 2: Tabela 32) foram assistidas consultas, com participação activa na colheita e elaboração da história clínica, exame físico, plano de diagnóstico, e pequenos procedimentos como colheita de sangue venoso para análises clínicas, venopunção para colocação de catéter e sistema de venoclise, drenagem de líquido de derrame torácico e abdominal, algaliação, limpeza e observação do conduto auditivo externo, limpeza de feridas, administração de fármacos por via oral e por via injectável, imunização, realização de pensos simples, teste de lâmpada de Wood, raspagens cutâneas.

No serviço de Internamento, foram prestados cuidados de higiene e alimentação aos doentes internados, foram administradas medicações por diversas vias (oral, subcutânea, intramuscular, endovenosa e tópica), e foram realizados pequenos procedimentos, como colheitas de sangue venoso para análises clínicas, venopunção para colocação de catéter e sistema de venóclise, algaliação, lavagem vesical, enemas, limpeza de feridas, realização de pensos simples, fisioterapia e manutenção de animais em câmara de oxigénio e administração de Oxigénio pela utilização do concentrador de Oxigénio. Foi também realizada a monitorização dos animais internados, que incluía a monitorização da frequência cardíaca e respiratória, pulso, temperatura, auscultação cardíaca e pulmonar, produção de urina, pressão arterial, entre outras, conforme a necessidade de cada caso.

No serviço de Cirurgia (Anexo 2: Tabela 33), participou-se em diversos tipos de cirurgia, electivas ou de urgência, em diversas áreas. Aqui foi possível participar na preparação cirúrgica dos pacientes, que incluía a colocação do catéter endovenoso e sistema de venóclise, administração da pré-medicação anestésica, indução anestésica, colocação do tubo endotraqueal, tricotomia e desinfecção da área a intervencionar e preparação do material cirúrgico e dos aparelhos de monitorização anestésica. Durante a cirurgia desempenharam-se as funções de anestesista, ajudante de cirurgião e circulante, consoante as necessidades e requisição do cirurgião responsável. Foi possível a realização de pequenas intervenções como suturas de pele, realização de orquiectomias em gatos, e auxílio na realização de orquiectomias em cães e ovario-histerectomias em cadelas e gatas, destartarizações e ainda auxílio noutros tipos de cirurgias mais complexos. No período pós-cirúrgico, o estagiário foi responsável pela monitorização do paciente no período de recobro, e participou na escolha da medicação pós-cirúrgica a prescrever. No momento da entrega dos doentes aos seus proprietários, contactou-se com os proprietários, fazendo as recomendações necessárias quanto aos cuidados no período pós-cirúrgico, à medicação a administrar, e indicação da data da consulta de reavaliação. Realizaram-se assim, consultas no âmbito pós-operatório, em que eram reavaliadas as suturas, removidos pontos de pele, realizada a limpeza das feridas cirúrgicas, drenados seromas, realizados de pensos, entre outros, consoante a necessidade de cada caso.

No serviço de Imagiologia, assistiu-se e participou-se na realização de exames radiográficos, ecográficos e tomografias axiais computadorizadas de casos clínicos internos e externos. Aqui participou-se no posicionamento e contenção dos pacientes para a realização dos diversos exames, anestesia, revelação dos exames radiográficos e interpretação dos exames realizados.

II. INTRODUÇÃO: INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO E DOENÇA ONCOLÓGICA EM CANÍDEOS

II.1. INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO

A infecção do tracto urinário (ITU) compreende uma grande variedade de entidades clínicas, sendo causada pela invasão microbiana de qualquer segmento do tracto urinário (Senior, 2006).

A maioria das ITUs nos cães envolve infecção bacteriana do tracto urinário inferior, o qual é constituído pela bexiga e uretra. No entanto, a ascensão de bactérias para os ureteres e rins (ITU superior) pode ocorrer e ser uma sequela de uma ITU inferior (Graver, 2003). A inflamação e infecção da bexiga (cistite) é comum nos animais domésticos, ao contrário da inflamação da uretra e ureteres, sem a ocorrência concomitante de cistite, que é rara (Newman, Confer & Panciera, 2007).

Comparando a incidência dos diversos agentes uropatogénicos, a incidência de infecção bacteriana é muito superior à de infecções por micoplasma, clamídia, vírus ou fungos (Graver, 2003).

A ITU ocorre em associação a um comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, o qual pode ser transitório ou permanente (Bartges, 2005).

A maioria das infecções do tracto urinário inferior responde rápida e apropriadamente à terapêutica antibiótica adequada (ITU simples), ao contrário das ITUs complicadas em que é frequente existir uma falha de resposta ao tratamento com antibióticos, ou ocorrer uma recidiva da infecção pouco tempo após o fim do tratamento (Graver, 2003).

As ITUs simples geralmente ocorrem devido a uma alteração transitória, auto-limitante e reversível nas defesas do hospedeiro (Kogika, 2009) e não existindo alterações estruturais ou funcionais subjacentes nos mecanismos de defesa do mesmo (Graver, 2003). Por outro lado, nas ITUs complicadas há uma alteração/doença que interfere com o mecanismo de defesa normal e a infecção bacteriana ocorre secundariamente (Kogika, 2009).

Sempre que um cão reprodutivamente intacto, ou com uma doença que seja predisponente para o aparecimento de ITU (insuficiência renal, diabetes mellitus, hiperadrenocorticism) desenvolve uma ITU, esta deve ser considerada complicada (Bartges, 2005). As principais alterações relacionadas com o desenvolvimento de ITUs complicadas são:

- alterações da micção, que frequentemente resultam em esvaziamento incompleto da bexiga e retenção de urina, as quais facilitam a multiplicação bacteriana no tracto urinário (Graver, 2003)
- defeitos anatómicos ou lesão da mucosa (Graver, 2003)
- alterações do urotélio (Kogika, 2009)
- alteração do volume e composição da urina (Kogika, 2009)
- alteração da competência imunitária do hospedeiro (Kogika, 2009).

Relacionadas com esta última, estão alterações sistémicas, tais como insuficiência renal, hiperadrenocorticism, administração prolongada de corticosteroides, neoplasia e diabetes

mellitus (Graver, 2003). Assim que as causas são corrigidas ou eliminadas, a ITU é erradicada (Kogika, 2009).

Se não se conseguir eliminar essas causas poderá haver recorrência da infecção.

Se a nova infecção for causada pela mesma espécie e estirpe de microrganismo dentro de no máximo duas semanas após a cessação do tratamento da ITU anterior, esta é designada por recidiva (Kogika, 2009), e pode ter como causas a utilização de um antibiótico inapropriado, ou em dose inadequada, a emergência de resistência ao antibiótico utilizado, ou incapacidade de eliminar os factores que alteraram os mecanismos de defesa do hospedeiro e permitiram a persistência das bactérias (Graver, 2003).

Quando a nova infecção ocorre mais de duas semanas após o final do tratamento da ITU prévia, a urina esteve estéril durante esse intervalo e é causada por um agente diferente, então houve reinfecção, o que sugere que possa haver um comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, nomeadamente um defeito anatómico, urolitíase, retenção urinária, neoplasia ou incompetência imunitária (Kogika, 2009).

Reinfecções com bactérias menos invasivas como *Pseudomonas aeruginosa* ou *Klebsiella pneumoniae* sugerem incompetência do sistema imunitário do hospedeiro (Graver, 2003). Apesar de pouco frequente pode haver o desenvolvimento de uma nova ITU por um agente diferente durante o tratamento da primeira ITU. Esta ocorrência é designada por superinfecção e pode estar relacionada com alterações anatómicas severas, algaliação crónica ou após procedimentos cirúrgicos (Kogika, 2009).

II.1.1. ETIOLOGIA E PATOGÉNESE

As causas de ITU são muito variadas, no entanto, a infecção bacteriana é a causa mais comum.

A predisposição para a ITU ocorre quando há uma estagnação da urina devido a obstrução, esvaziamento incompleto da bexiga durante a micção, ou trauma do uroepitélio. Outros factores de risco incluem a algaliação, vaginoscopia, vaginite, incontinência urinária, ou a administração prolongada de medicamentos, tais como antibióticos, que induzem a resistência bacteriana (Newman *et al.*, 2007).

Pensa-se que as ITUs são causadas principalmente por flora intestinal ou cutânea que por invasão retrógrada ascende através da uretra até à bexiga (Graver, 2003) e ocorrem quando as bactérias têm a capacidade de ultrapassar os mecanismos de defesa e aderir ou invadir a mucosa (Newman *et al.*, 2007).

Segundo um estudo (Johnson, Kaster, Kuskowski & Ling, 2003) é a elevada virulência intrínseca do agente patogénico que constitui o principal pré-requisito para que uma estirpe seja capaz de causar ITU, mesmo que essa estirpe não seja a predominante no reservatório rectal.

Além da invasão retrógrada, também existe a possibilidade de disseminação hematogêna de uma infecção sistêmica, sendo esta via muito menos frequente. Como o sangue deve passar através dos capilares glomerulares no córtex renal antes de chegar à medula, a maioria das bactérias hematogêneas não alcançam a medula renal, já que, aparentemente o tecido do córtex renal é mais resistente à infecção do que o tecido medular (Bartges, 2005). Na grande maioria das vezes, as ITUs são causadas apenas por um organismo, embora também possam existir infecções mistas em que estão presentes duas ou mais espécies diferentes de agentes bacterianos. Os agentes bacterianos mais comuns nas ITUs em canídeos incluem a *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (Graver, 2003). De entre estes é a *Escherichia coli* o mais frequentemente encontrado na urina de canídeo, conforme se demonstra na Tabela 1, mas relativamente aos outros agentes existem maiores flutuações nas suas frequências (Ball, Rubin, Chirino-Trejo & Dowling, 2008).

Tabela 1 - Bactérias isoladas de ITUs em canídeos

Agente patogénico	Frequência de isolados de cães com ITU em diversos estudos (%)				
	1)	2)	3)	4)	
<i>E. coli</i>	42	55,8	73,9	51,1	1) – Pomba <i>et al.</i> , 2009
<i>Staphylococcus spp.</i>	14	0	4,3	16,5	
<i>Klebsiella spp.</i>	2	5,3	8,6	1,1	2) – Bubenik, Hosgood, Waldron & Snow, 2007
<i>Enterococcus spp.</i>	6	6,2	26,1	10,2	
<i>Proteus spp.</i>	17	11,5	8,6	5,9	3) – Torres <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas spp.</i>	7	1,8	8,6	1,3	
<i>Streptococcus spp.</i>	7	6,2	13,0	4,6	4) – Ball <i>et al.</i> , 2008
Número de isolados	249	113	23	473	

Os principais factores que determinam o estabelecimento ou não de uma ITU são a virulência bacteriana e a quantidade de organismos invasores (Graver, 2003).

A infecção do tracto urinário geralmente envolve colonização da genitália, migração das bactérias ao longo da uretra e aderência dos microrganismos ao urotélio. Esta capacidade de aderência evita a sua remoção durante a micção e permite a proliferação bacteriana entre micções (Graver, 2003) e uma entrega de toxinas bacterianas à mucosa mais eficiente (Senior, 2006). É facilitada por fímbrias, apêndices rígidos, filamentosos e proteicos, que são encontradas em várias bactérias gram-negativas, como por exemplo na *Escherichia coli*. Outros factores que aumentam a virulência bacteriana incluem o antígeno capsular K, o qual interfere com a opsonização e a fagocitose, e o antígeno O encontrado em endotoxinas

e que diminui a contractilidade do tecido muscular liso. Este último, através da sua acção pode parar o peristaltismo ureteral e deste modo facilitar a ascensão de bactérias da bexiga até ao rim (Graver, 2003).

Os agentes uropatogénicos tipicamente têm mais que um factor de virulência, e por isso, a ausência de um factor não resulta necessariamente na perda de patogenicidade. Além disso, bactérias que são não-patogénicas num animal normal, podem tornar-se patogénicas num animal com comprometimento das suas defesas (Bartges, 2005).

Assim que os agentes bacterianos têm acesso à lâmina própria, causam lesões vasculares e inflamação. Estas lesões predispõem a hemorragia, perda de fibrina, e se severas, podem levar a necrose isquémica. Estes fenómenos são acompanhados, normalmente, por ulceração da mucosa. Como em qualquer lesão acompanhada de colonização bacteriana, e como componente da lesão vascular, os neutrófilos estão presentes (Newman *et al.*, 2007).

No caso de existir cistite bacteriana, geralmente a sua parede apresenta-se espessada, por edema e infiltrado celular inflamatório, e hemorrágica. Na mucosa podem ser encontrados focos de erosão ou ulceração, coágulos sanguíneos aderentes e exsudado (Newman *et al.*, 2007).

O primeiro passo no encontro entre o hospedeiro e o agente patogénico é a ligação do patogénico ao epitélio do hospedeiro através da interacção entre uma adesina patogénica e um receptor no hospedeiro (Kau, Hunstad & Hultgren, 2005).

II.1.1.1. *ESCHERICHIA COLI*

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria encontrada naturalmente no intestino de todos os humanos e muitas outras espécies animais e é o maior organismo patogénico a causar ITUs em humanos, cães e gatos (citado por Siqueira *et al.* 2009).

A *E. coli*, sendo uma bactéria gram-negativa possui, na sua parede celular, uma fina camada de peptidoglicano revestida externamente por uma membrana de lipopolissacárido (LPS), sendo que este último contribui grandemente para a patogenicidade deste tipo de bactérias (Tizard, 2004).

A *Escherichia coli* uropatogénica (*Uropathogenic Escherichia coli*, UPEC) difere da *E.coli* comensal do intestino devido à presença de factores de virulência especializados que promovem a infecção extraintestinal (citado por Siqueira *et al.* 2009).

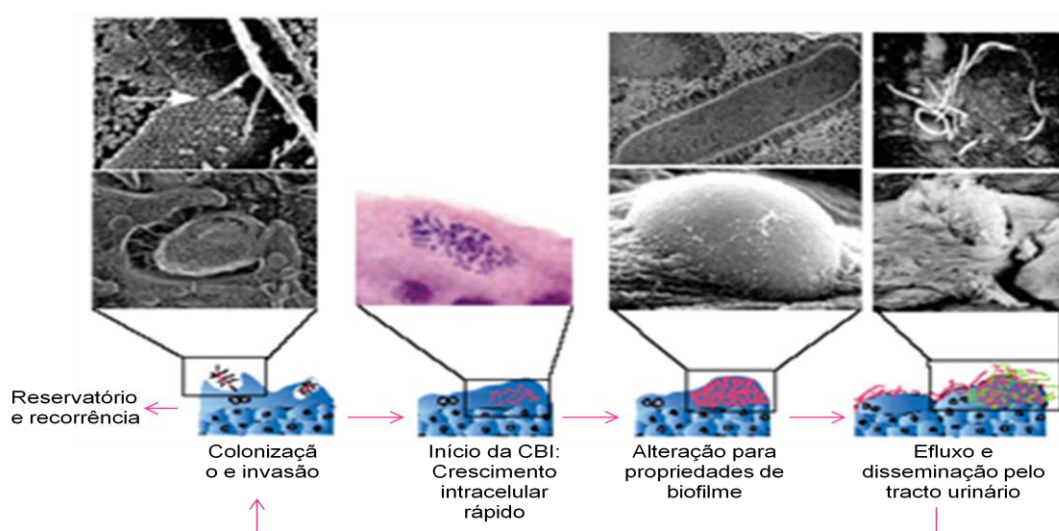
Estirpes uropatogénicas de *E. coli* possuem vários mecanismos para sobreviverem e persistirem no tracto urinário (Kau *et al.*, 2005). *E. coli* isoladas de canídeos têm uma grande habilidade para produzir colicinas, as quais aumentam a permeabilidade vascular, hemolisinas, que aumentam a capacidade invasiva através de danos tissulares e β -lactamases, que causam resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Além disso, ainda têm a capacidade de fermentar o dulcitol, o qual está associado à resistência à fagocitose (Graver, 2003).

Assim que a UPEC chega à bexiga pelo menos duas adesinas, pili tipo 1 e P, estão envolvidas no desenvolvimento de cistite e pielonefrite, respectivamente (Kau *et al.*, 2005). A base estrutural do tropismo das UPEC para a bexiga e rins foi estudada por co-cristalização da adesina do pili tipo 1 (FimH) e da adesina do pili P (PapG) com os receptores correspondentes (Dodson *et al.*, 2001). As fímbrias P são codificadas pelo gene *pap* e provavelmente contribuem para a adesão e colonização do tracto. A adesina PapG, localizada nas fímbrias P, tem três variantes, classe I, II e III, em que a classe I é predominantemente encontrada nas fezes, e provavelmente tem pouca importância na patogénese da UPEC canina. A classe II é geralmente associada a pielonefrite, mas no estudo realizado por Siqueira *et al.* (2009) esse gene não foi encontrado em nenhum isolado com ITU. A classe III é frequentemente associada a cistite, e no mesmo estudo esse gene foi encontrado em 19,6% dos isolados com ITU.

A interacção das UPEC com as células epiteliais da bexiga mediada pela FimH inicia uma cascata que resulta na entrada das bactérias ligadas nas células superficiais do uroepitélio. As bactérias com pili tipo-1 entram nas células através da interacção com lípidos membranários e uroplaquinas, em que estes últimos são componentes da camada impermeável do uroepitélio necessária ao funcionamento da bexiga. Esta interacção e a entrada das UPEC nas células culmina na formação de comunidades bacterianas intracelulares (CBI) (Figura 1) (citado por Kau *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento destas CBI, bactérias de forma bacilar e crescimento rápido maturam e levam à formação de comunidades constituídas por bactérias cocoides, de crescimento mais lento, organizadas em biofilmes. Posteriormente, as CBI mudam para uma forma bacilar com motilidade, o que permite que as bactérias da periferia da CBI se destaquem e migrem da célula hospedeira, facilitando a sua disseminação pelo tracto urinário (citado por Kau *et al.*, 2005). Algumas destas bactérias tomam uma morfologia filamentosa (citado por Rosen *et al.*, 2008). Posteriormente, a replicação bacteriana cessa originando um reservatório latente na parede da bexiga, o qual pode ser reactivado (por mecanismos ainda desconhecidos) e desencadear uma ITU recorrente (citado por Kau *et al.*, 2005).

Figura 1 – Sequência de fenómenos que levam à formação dos reservatórios intracelulares de UPEC e reinfeção (adaptado de Kau *et al.*, 2005)



Outros dos factores de virulência da UPEC são os pilus S, em que a subunidade *sfaS* medeia as interacções bacterianas com o tracto urinário, e de acordo com os resultados obtidos por Siqueira *et al.* (2009) foi demonstrado que esta subunidade tem um papel importante na adesão das UPEC ao epitélio urogenital e no desenvolvimento de ITU nos cães.

As estirpes de *E. coli* implicadas na ITU normalmente expressam genes para citotoxinas, como a hemolisina e o factor necrosante citotóxico 1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*, *cnf 1*). A α -hemolisina causa a lise de eritrócitos em todos os mamíferos (citado por Johnson, 1991), e também de leucócitos, e células endoteliais e renais (citado por Emödy, Kerényi & Nagy, 2003). No estudo de Siqueira *et al.* (2009) o gene que codifica essa citotoxina, o *hlyA*, foi encontrado em 33,0% dos isolados de ITU. O *cnf 1* evoca a morte por apoptose das células epiteliais da bexiga, e no mesmo estudo o *cnf1* foi detectado em 21,6% das estirpes de ITU. Vários destes factores de virulência foram encontrados em proporção significativamente superior nos isolados de ITU do que nos isolados de fezes, o que sugere que os isolados de UPEC podem ser diferenciados de isolados de *E. coli* fecais com base na presença dos factores de virulência que contribuem para a patogenicidade do microorganismo.

II.1.1.2. *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

Stenotrophomonas maltophilia é o único membro do género *Stenotrophomonas* (Denton & Kerr, 1998). É um *bacillus* ubiquitário, aeróbio, Gram-negativo e não fermentador de baixa virulência, considerado um agente patogénico incomum em indivíduos imunocompetentes (citado por Falagas, Kastoris, Vouloumanou & Dimopoulos, 2009). Possui motilidade através de vários flagelos polares (Denton & Kerr, 1998) e tem a capacidade de formar biofilmes (Bonaventura, Spedicato, D'Antonio, Robuffo & Piccolomini, 2004).

S. maltophilia pode causar uma grande variedade de infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos, naqueles com predisposição para o desenvolvimento de infecções respiratórias, em pacientes com cateteres venosos centrais ou em pacientes com história prévia de hospitalização ou de uso de fármacos antimicrobianos (Falagas *et al.*, 2009).

S. maltophilia é capaz de causar bacteriemia, endocardite, pneumonia, mastoidite, peritonite, infecções em pacientes submetidos a diálise peritoneal, meningite, infecções oculares, ósseas e das articulações, infecções do tracto urinário, de tecidos moles e de feridas. As infecções por *S. maltophilia* estão a tornar-se progressivamente mais importantes (citado por Falagas *et al.*, 2009) e tem havido um aumento na prevalência de isolados a partir de amostras clínicas ao longo dos últimos anos (citado por Waters *et al.*, 2007). Diversos casos reportados em Humanos têm demonstrado o potencial da *S. maltophilia* de causar infecções invasivas como um agente patogénico oportunista em pacientes imunocomprometidos ou quando ela é inadvertidamente introduzida num local normalmente estéril (citado por Waters *et al.*, 2007). Num estudo realizado por Shigemura, Arakawa, Tanaka e Fujisawa (2009) sobre ITUs complicadas em humanos, verificou-se que a *S. maltophilia* se encontrou entre os isolados mais comuns.

No estudo realizado por Waters *et al.* (2007), observou-se que todos os isolados de *S. maltophilia* eram altamente imunoestimuladores, já que esta induziu a expressão de Interleucina (IL)-8, a qual é uma quimiocina que recruta neutrófilos. *S. maltophilia* também induziu a expressão de factor de necrose tumoral- α (*Tumor necrosis factor- α* , TNF- α), o qual constitui uma potente citocina inflamatória que induz a activação de neutrófilos e macrófagos.

Têm sido descritos antígenos O somáticos e antígenos H flagelares, em que foram identificados 31 sub-tipos de antígenos O (citado por Denton & Kerr, 1998).

Várias comunicações por vários autores têm descrito várias enzimas extracelulares produzidas pela *S. maltophilia*, incluindo a DNase, RNase, fibrinolisa, lipases, hialuronidase, protease e elastase. Um estudo propôs que estas enzimas podem ter um papel na patogénese de infecções associadas a esta bactéria (citado por Denton & Kerr, 1998).

A bacteriemia é uma manifestação comum da infecção por *S. maltophilia*, que pode ser secundária a infecção pulmonar, urinária ou gastrointestinal (citado por Denton & Kerr, 1998).

Esta bactéria tem as propriedades esperadas de um patógeno oportunista, e estes microrganismos apresentam resistência antimicrobiana intrínseca e causam infecções que podem resultar em morbilidade aumentada em pacientes com alterações do sistema imunitário (Waters *et al.*, 2007)

A maioria das estirpes de *S. maltophilia* é caracterizada pela sua resistência a vários antibióticos de largo espectro usados correntemente, incluindo aqueles da classe dos carbapenemos (Denton & Kerr, 1998).

II.1.1.3. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

A *Klebsiella pneumoniae* é uma *Enterobacteriaceae* gram-negativa comum nas infecções do tracto urinário, o qual é o seu local de infecção mais comum, apesar de também ser reconhecida como causa de infecção do tracto respiratório em hospedeiros imunocomprometidos (citado por Rosen *et al.*, 2008).

Apesar de esta bactéria ser reconhecida como um dos mais importantes patógenos oportunistas gram-negativos, não há muita informação acerca dos mecanismos através dos quais esta bactéria causa infecção (Struve, Bojer & Krogfelt, 2008).

Vários factores de virulência têm sido sugeridos para estas bactérias. A maioria dos isolados clínicos produz grandes quantidades de polissacáridos capsulares cobrindo a superfície bacteriana. Também o LPS e os sistemas de aquisição de ferro têm sido identificados como significantes factores de virulência em estudos *in vivo* que usam modelos de infecção. Assim, a cápsula e o LPS têm mostrado conferir protecção contra a reacção imunitária do hospedeiro, protegendo contra a opsonização e fagocitose (Struve *et al.*, 2008).

Apesar de a capacidade das bactérias aderirem à superfície mucosa ser considerada essencial no desenvolvimento da infecção bacteriana, o conhecimento da influência dos factores de adesão específicos da *K. pneumoniae* é esparso (Struve *et al.*, 2008).

A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* apresenta capacidade de produzir duas adesinas, fímbrias tipo 1 e tipo 3.

As fímbrias tipo 3 permitem a adesão a diversos tipos de células *in vitro*, mas no entanto, o receptor para estas fímbrias ainda não foi identificado, assim como também ainda não foi avaliada a sua influência na virulência deste agente patogénico (citado por Struve *et al.*, 2008).

Num estudo realizado em ratos (Rosen *et al.*, 2008), foi demonstrado que, na fase inicial da ITU, os títulos de *K. pneumoniae* são inferiores aos títulos de UPEC, o que pode estar relacionado, em parte, com as pili tipo 1. No entanto, em tempos mais avançados da infecção, estes títulos já se mostraram semelhantes.

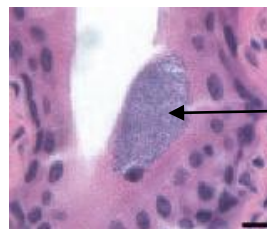
A estirpe de *K. pneumoniae* era portadora do gene *fimK*, o qual reduz a expressão de pili tipo 1 através de mecanismos ainda não conhecidos, e não expressava o gene *fimX*, o qual aumenta a expressão desses pili. Assim, estes factores podem ser responsáveis pela menor eficácia da *K. pneumoniae* como agente uropatogénico relativamente às UPEC (Rosen *et al.*, 2008).

As fímbrias tipo 1 medeiam a adesão a estruturas com manose nas células hospedeiras e na matriz extracelular e estão presentes em várias espécies de *Enterobacteriaceae*, como

por exemplo na *E. coli*. Apesar de no estudo realizado por Rosen *et al.* (2008) ter sido analisada a expressão das pili tipo 1 na *K. pneumoniae*, ainda não foi confirmado se elas apresentam o mesmo mecanismo de acção das pili tipo 1 da *E. coli*, ou seja, se existem diferenças estruturais ou funcionais entre estas duas espécies que possam afectar a patogénese na ITU.

No mesmo estudo (Rosen *et al.*, 2008) também se verificou que a estirpe de *K. pneumoniae* também teve capacidade de formar CBIs (Figura 2), mas em quantidade significativamente inferior à *E. coli*. Assim, foi demonstrado que a capacidade de utilizar um nicho intracelular durante a fase aguda da ITU não é específica da UPEC.

Figura 2 – CBIs nas células epiteliais superficiais da bexiga de rato, 6 horas após infecção (adaptado de Rosen *et al.*, 2008)



Comunidade bacteriana intracelular de *K. pneumoniae*

II.1.1.4. *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS*

Staphylococcus intermedius é um membro da flora normal dos cães e é também um dos seus maiores agentes oportunistas (citado por Bannoehr, Zakour, Wallwe, Guardabassi & Thoday, 2007).

O nível de diversidade fenotípica e genotípica observada entre os isolados de *S. intermedius* levou alguns investigadores a especular que poderia existir um grupo de *S. intermedius* constituído por várias espécies ou subespécies (citado por Bannoehr *et al.*, 2007). Assim, depois de desenvolvidos vários estudos (Devriese *et al.*, 2005), foi determinada uma nova espécie, a *Staphylococcus pseudintermedius*.

Concluiu-se que as estirpes isoladas de cães devem ser reportadas como *S. pseudintermedius*, excepto se através de investigação genómica se mostrar que pertencem a outra espécie (Devriese, Hermans, Baele, Haesebrouck, 2009).

Recentemente, *S. pseudintermedius* têm sido encontradas como importantes agentes patogénicos em infecções da pele e tecidos moles nos animais de companhia (Bannoehr *et al.*, 2007).

Estas bactérias são cocos gram-positivos predominantemente organizados em grupos. Quando isolados em agar sangue dão origem a colónias não-pigmentadas e rodeadas por uma zona dupla de hemólise, em que a banda externa é incompletamente hemolítica. Esta banda, após ser colocada a 4°C, torna-se completamente hemolítica, o que é típico da β -hemolisina dos *Staphylococcus*. Estas estirpes são catalase e coagulase positivas mas são negativas para o factor de aglutinação. Produzem DNase, são positivas no teste da acetoina, β -glucosidase, arginina di-hidrolase, urease e redução de nitrato, e não produzem β -glucoronidase (Devriese *et al.*, 2005).

A parede celular das bactérias gram-positivas representa uma organela superficial que além das suas funções como elemento do citosqueleto, também promove interações entre a bactéria e o seu ambiente envolvente.

O peptidoglicano da parede celular tem ácido tecóico, polissacáridos e proteínas ligadas covalente e não-covalentemente. Estas moléculas fornecem, ao envelope bacteriano, propriedades específicas da espécie e da estirpe, que contribuem para a virulência bacteriana, para interações com o sistema imunitário do hospedeiro e para o desenvolvimento de infecção.

Os *Staphylococcus* têm poucas estruturas fimbriais, e por isso a adesão às células do hospedeiro e a invasão dos tecidos baseia-se na adesão mediada por proteínas superficiais. A maioria das proteínas de superfície envolvidas são substratos da sortase, ou seja, ligam-se covalentemente à parede celular através da sortase, uma transpeptidase ancorada à membrana (citado por Marraffini, DeDent & Schneewind, 2006).

II.1.2. MECANISMOS DE DEFESA

Apesar de os mamíferos possuírem vários mecanismos de defesa inatos ou adquiridos, é nas superfícies do organismo que os agentes invasores são encontrados em primeiro lugar e repelidos ou destruídos (Tizard, 2004).

O desenvolvimento de ITU depende de um desequilíbrio entre o agente infeccioso que tenta ascender e invadir o tracto urinário e a resistência do hospedeiro que tenta eliminar ou expelir esse agente. Assim, o estado dos mecanismos de defesa do hospedeiro parece ser importante na patogénese da ITU. Apesar de a ITU poder ocorrer quando um microrganismo de alta virulência invade o tracto urinário normal, muitas vezes existe também uma alteração anatómica, funcional ou imunitária que numa situação normal impediria a invasão microbiana (Senior, 2006).

II.1.2.1. MECANISMOS DE DEFESA ANATÓMICOS E FISIOLÓGICOS

A primeira linha de defesa contra a ITU está concentrada na prevenção da aderência das UPEC à mucosa da bexiga (citado por Sivick & Mobley, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 – Mecanismos locais de defesa (adaptado de Senior, 2006)

Micção normal

- **Fluxo de urina adequado**
- **Frequência de micção**
- **Esvaziamento completo da bexiga**

Tabela 2 – (Continuação)

Estruturas anatómicas <ul style="list-style-type: none"> • Zona uretral de alta pressão • Características do urotélio uretral • Peristaltismo uretral • Fracção prostática antibacteriana • Comprimento da uretra • Válvula ureterovesical e peristaltismo ureteral
Barreira mucosa <ul style="list-style-type: none"> • Produção de anticorpos • Camada superficial de glucosaminoglicanos • Propriedades antimicrobianas intrínsecas da mucosa • Interferência bacteriana • Exfoliação celular
Propriedades antimicrobianas da urina <ul style="list-style-type: none"> • pH da urina • hiperosmolaridade • alta concentração de ureia • ácidos orgânicos

Normalmente a bexiga é resistente à infecção e as bactérias contaminantes são rapidamente eliminadas pelo fluxo normal de urina normal (Newman *et al.*, 2007). Durante a micção, mais de 95% das bactérias não-aderentes presentes no tracto urinário inferior são eliminadas, devido ao efeito mecânico, com o arrastamento das bactérias que ocorre, e quanto maior a produção de urina e a frequência de micção, maior este efeito (Graver, 2003).

Normalmente há bactérias em quantidades crescentes da zona média para a distal da uretra, mas raramente estes organismos são causa de ITU em canídeos saudáveis, estando o restante tracto urinário asséptico. A zona de alta pressão na zona média da uretra e as contracções uretrais espontâneas evitam a ascensão de bactérias. Diferenças morfológicas no urotélio, nomeadamente receptores epiteliais reduzidos, também ajudam a diminuir o número de bactérias que podem colonizar as zonas média e proximal da uretra (Graver, 2003).

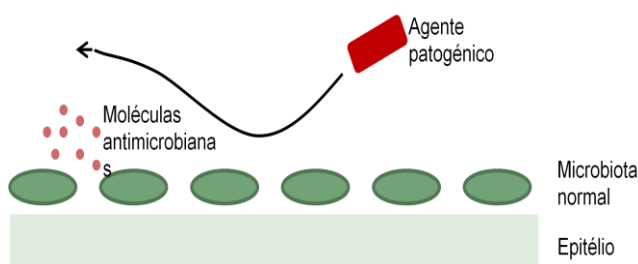
Nos machos, o comprimento da uretra, o seu lúmen mais estreito, assim como as secreções prostáticas (em que um dos componentes é o zinco com propriedades bacteriostáticas/bactericidas) contribuem para uma menor incidência de ITU (Graver, 2003), ao contrário das fêmeas, que por terem uma uretra relativamente curta, a barreira contra as

infecções ascendentes é também mais curta, o que faz com que as cistites bacterianas sejam mais frequentes nelas (Newman *et al.*, 2007). Em ambos os sexos, a existência de uma estrutura semelhante a uma válvula na junção vesicoureteral também confere protecção contra a ascensão de bactérias até aos rins (Graver, 2003).

A colonização das membranas mucosas da vulva e prepúcio por flora não-patogénica também contribui para diminuir a colonização por agentes patogénicos, dado que a flora normal ocupa a maioria dos receptores, produz bacteriocinas que interferem com o metabolismo dos agentes uropatogénicos, e tem uma elevada afinidade, mas baixas necessidades, para os nutrientes essenciais requeridos pelos uropatógenos (Figura 3) (Graver, 2003).

Além disso, as secreções produzidas pela mucosa também contribuem para que a

Figura 3 – Papel da microbiota normal na exclusão de agentes patogénicos, por competição (adaptado de Tizard, 2004)



aderência dos uropatógenos ao urotélio seja dificultada, dado que contêm imunoglobulinas (Graver, 2003), nomeadamente a Imunoglobulina (Ig) A (Newman *et al.*, 2007), que revestem as bactérias patogénicas, e glucosaminoglicanos que formam uma barreira protectora sobre a superfície epitelial (Graver, 2003).

As propriedades antibacterianas da urina constituem um importante mecanismo de defesa contras as ITUs. A urina é frequentemente bacteriostática e por vezes bactericida, dependendo da sua composição. A combinação de um pH baixo (Graver, 2003), alta osmolalidade (Newman *et al.*, 2007), altas concentrações de ureia e ácidos orgânicos fracos na urina concentrada inibem o crescimento bacteriano. A urina com baixa densidade específica produzida por animais com poliúria e polidipsia tem menos propriedades antibacterianas que a urina hiperestenúrica (Graver, 2003).

Um outro mecanismo de defesa local consiste na exfoliação de células infectadas por um mecanismo idêntico à apoptose, o qual é promovido pela FimH. A morte de células uroepiteliais induzida pela UPEC está correlacionada com o aumento da diferenciação das células da bexiga e é também dependente da expressão do receptor uroplaquina IIIa, que após sensibilização sofre fosforilação e os níveis de cálcio intracelulares aumentam (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Nos anos 50, foi descrita pela primeira vez a existência de uma proteína de alto peso molecular presente na urina de humanos, a qual foi designada de proteína Tamm-Horsfall. Só há cerca de 30 anos é que se descobriu a sua capacidade de se ligar a fímbrias da *E. coli*, nomeadamente às fímbrias tipo-1, através dos seus receptores de manose, inibindo assim a interacção com os receptores de uroplaquinas. A proteína Tamm-Horsfall parece

também ter uma actuação como molécula imunorreguladora dos sistemas inato e adquirido, através da sua capacidade para activar células dendríticas (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Em adição, a imunidade humoral e a imunidade celular presentes na urina e no tracto urinário também contribuem para a protecção (Bartges, 2007).

II.1.2.2. MECANISMOS DE DEFESA IMUNITÁRIOS, INATOS E ADQUIRIDOS

As superfícies corporais são protegidas pela resposta humoral e pela resposta celular. As imunoglobulinas (Ig) produzidas nas superfícies corporais incluem IgA, IgM, IgE e IgG. Destas, a que tem uma acção mais notável é a IgA, a qual é a predominante nas secreções superficiais, é encontrada em quantidades significativas na saliva, fluído intestinal, nasal e secreções traqueais, lágrimas, leite, colostro, urina e secreções do tracto urogenital. Esta imunoglobulina está presente em pequenas quantidades na urina normal, e é produzida pelo tecido linfóide existente nas paredes do tracto urinário. A IgA parece ter evoluído especificamente para protecção das superfícies corporais, tendo ela uma actuação por exclusão imune, em que a sua principal função é evitar a aderência de bactérias e vírus às superfícies epiteliais (Tizard, 2004).

Enquanto os mecanismos de defesa locais constituem a defesa inicial à infecção, os mecanismos de defesa sistémicos têm um papel na prevenção da disseminação hematogénea dos agentes patogénicos a partir do tracto urinário (Bartges, 2005).

Como mencionado anteriormente, a maioria das ITUs são causadas por estirpes de UPEC, que possuem vários factores de virulência. Deste modo, a explicação que se segue, diz respeito à ITU causada por UPEC.

De entre os imunócitos envolvidos na defesa contra a ITU, são os granulócitos que possuem um papel preponderante, (Godaly, Proudfoot, Offord, Svanborg, & Agace, 1997), mais especificamente os neutrófilos que são o primeiro tipo celular a migrar para a bexiga na ocorrência de uma ITU (citado por Sivick, Schaller, Smith & Mobley, 2010).

Num estudo realizado por Sivick *et al.* (2010), além dos neutrófilos, que constituíram o principal infiltrado, também foram encontrados infiltrados mistos constituídos por monócitos e neutrófilos.

Adicionalmente, células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (CDs), e linfócitos de tipo inato, como células T $\gamma\delta$ têm sido implicadas na defesa do hospedeiro à ITU (Engel *et al.*, 2006).

Os neutrófilos contêm um núcleo constituído por 3 a 5 lobos ligados entre si por finos filamentos de cromatina, e contêm organelas conhecidas como grânulos primários e secundários. Nestes grânulos são alojadas enzimas líticas e substâncias bactericidas, como por exemplo, peroxidase, lisozima, enzimas hidrolíticas, collagenase, lactoferrina, entre outras, sendo que estes grânulos participam na digestão do material estranho fagocitado.

Estas células não residem nos tecidos, mas circulam no sangue e migram rapidamente para os locais de lesão e infecção. Os factores quimiotáticos são libertados pelas bactérias, por células endoteliais, e podem ser também provenientes dos tecidos lesados. Os neutrófilos normalmente circulam na corrente sanguínea, mas na inflamação eles têm a capacidade de se ligar à parede dos vasos e posteriormente, atravessá-la (Tizard, 2004).

Os monócitos são leucócitos mononucleares, produzidos na medula óssea, que entram na circulação sanguínea, aumentam de tamanho, migram para os tecidos e maturam, dando origem a macrófagos ou células dendríticas. Os macrófagos são de maior tamanho relativamente aos neutrófilos e possuem mais organelas críticas à fagocitose. Estas células possuem à sua superfície diversos tipos de receptores, incluindo os receptores tipo Toll (TLR) e receptores para anticorpos (Willey, Sherwood & Woolverton, 2008). As células dendríticas provêm da linhagem mieloide (citado por John & Nelson, 2007) e são os maiores constituintes do sistema mononuclear fagocitário no rim (Münz, Steinman & Fujji, 2005).

As células fagocíticas mencionadas anteriormente (macrófagos, CD, monócitos e neutrófilos) constituem um importante mecanismo de defesa contra microrganismos invasores. Estas células reconhecem, ingerem e destroem diversas espécies de microrganismos extracelulares pelo processo denominado fagocitose (Willey *et al.*, 2008).

Assim que os agentes invasores são digeridos em pequenos fragmentos antigénicos, podem ocorrer duas coisas: os neutrófilos tendem a expelir os fragmentos microbianos por exocitose; por outro lado, os macrófagos e as CDs continuam o processamento desses fragmentos até os apresentarem à sua superfície (Willey *et al.*, 2008).

Estas células não residentes são atraídas por mediadores como a IL-8 (Haraoka *et al.*, 1999) e TNF- α , libertados a partir de células que detectaram a presença de UPEC. Esta detecção pode ocorrer através de TLR, em particular TLR-4, que reconhecem LPS em bactérias gram-negativas (citado em Engel *et al.*, 2006). No entanto, o papel do LPS na activação dos TLR é um tópico de debate. Há autores que afirmam que a activação destes receptores requer fímbrias P das UPEC e é independente do reconhecimento do LPS, dado que as fímbrias P se podem ligar a glicosfingolípidos da superfície celular, com subsequente libertação de ceramida, a qual parece actuar como agonista do TLR-4. No entanto, segundo outros, há uma estimulação cooperativa dos TLR-4 pelo LPS e pelas fímbrias tipo-1, a qual se correlaciona com o nível de expressão de CD14 nas células da bexiga (citado por Sivick & Mobley, 2010).

O CD14 consiste numa molécula acessória necessária ao óptimo funcionamento do TLR4 em resposta ao LPS (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Por último, em estudos realizados por Mossman e Ashkar em 2008, foi demonstrado que as adesinas FimH das fímbrias tipo-1 interagem directamente com os TLR4, o que vem dar mais ênfase à estimulação pelas fímbrias, independente do LPS (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Além dos TLR-4, existem outros TLR envolvidos na resposta à ITU, como por exemplo os TLR-5 que reconhecem uma subunidade do flagelo das UPEC, sendo este último essencial à motilidade destas bactérias no tracto urinário (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Os TLR fazem a ligação entre o reconhecimento do agente patogénico e a activação de células imunitárias, e no tracto urinário, recrutam neutrófilos, os quais constituem o maior mecanismo de controlo da infecção (Bremers & Parmiani, 2000).

Estes receptores (TLR-4) são expressos em diversos tipos de células do sistema imunitário, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos e células B (Medzhitov, 2003), à superfície das membranas celulares, e quando sensibilizados, atraem fagócitos, activam macrófagos e células dendríticas, e induzem a secreção de diversas citocinas (Goldsby, Kindt, Osborne & Kuby, 2003), como por exemplo, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 (Medzhitov, 2003). O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos activados, cedo na inflamação, e isto é seguido pela produção de IL-1 e IL-6, e este factor actua muitas vezes conjuntamente com a IL-1. O TNF- α aumenta a sua própria produção pelos macrófagos e a de IL-1, IL-6, factor estimulante de colónias de macrófagos (*Macrophage colony stimulating factor*, M-CSF) e factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF). O TNF- α actua também sobre os neutrófilos aumentando a sua capacidade de destruir agentes patogénicos, e é um potente quimiotático de neutrófilos, atraindo-os para o local de infecção e aumentando a sua aderência ao endotélio vascular. Este factor estimula também a fagocitose e a produção de oxidantes por parte dos macrófagos (Tizard, 2004).

A IL-1, produzida por macrófagos após a estimulação dos receptores CD14 e TLR-4, também aumenta a aderência dos neutrófilos ao endotélio, e tem capacidade de activar linfócitos e é necessária para iniciar algumas formas de imunidade adquirida (Tizard, 2004).

A IL-6 também é produzida por macrófagos, sendo a sua produção estimulada por endotoxinas bacterianas, IL-1 e TNF- α (Tizard, 2004).

A IL-12 é uma citocina produzida por monócitos e macrófagos, CD, células B e queratinócitos. Pode ser acumulada dentro de macrófagos e liberta em grandes quantidades após activação destas células. Além disso, a IL-12 promove a actividade *T helper* (Th)1 pela indução da secreção de IL-2 e Interferão- γ (IFN- γ), e promove a proliferação e a citotoxicidade das células T e *natural killer* (Tizard, 2004).

Num estudo realizado por Schilling, Martin, Hung, Lorenz e Hultgren (2003), foi demonstrado que a expressão dos TLR-4 nas células uroepiteliais e também nas células hematopoiéticas existentes na parede da bexiga são importantes para a defesa contra a ITU, pois estes têm capacidade de gerar cascatas de sinalização para controlar a infecção e dirigir respostas imunitárias adquiridas (citado por Sivick & Mobley, 2010). Esta importância dos TLR-4 foi demonstrada num estudo desenvolvido em 2008, já que ratos que não expressavam este receptor (*tlr4*^{-/-}) desenvolveram invasão bacteriana da bexiga significativamente superior

comparativamente a ratos *wild-type* que expressavam este receptor, pois devido a esse defeito a produção de citocinas e quimiocinas e o recrutamento de neutrófilos mostrou-se insuficiente (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Na resposta imunitária à ITU por UPEC, há produção de IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , factor de estimulação de colónias de granulócitos (*granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF), péptidos antimicrobianos, entre outros, os quais são detectados na bexiga de mamíferos durante a infecção (citado por Sivick *et al.*, 2010). Num estudo efectuado em ratos, viu-se que a expressão do TNF- α está aumentada 1 hora após a inoculação, diminuindo esses valores algum tempo depois, provavelmente para prevenir os efeitos deletérios do TNF- α . Relativamente às outras citocinas e quimiocinas, elas atingiram níveis máximos cerca das 24 horas pós-inoculação, retornando aos níveis basais aproximadamente duas semanas depois. A IL-17A, devido à sua actuação tanto na resposta inata como na resposta adquirida, é considerada uma citocina imunomodulatória inata-adquirida (citado por Sivick *et al.*, 2010). A IL-17A contribui para a resposta inata através de um mecanismo que envolve a secreção de citocinas e quimiocinas (citado por Sivick & Mobley, 2010), promovendo indirectamente o influxo de macrófagos e neutrófilos para o local de infecção (Sivick *et al.*, 2010). Além de esta citocina ser característica de células Th17 CD4+, outros tipos de células também já foram reportados como secretores de IL-17A, incluindo células T citotóxicas, células T $\gamma\delta$, células T *natural killer*, neutrófilos, eosinófilos e monócitos (citado por Sivick *et al.*, 2010).

As células T $\gamma\delta$ epiteliais residentes encontradas na bexiga aumentam em resposta à ITU e expressam IL-17A na infecção por UPEC (citado por Sivick & Mobley, 2010), sendo a maior fonte desta citocina (Sivick *et al.*, 2010). Esta população celular de resposta rápida pode funcionar juntamente com outros factores inatos para mediar o influxo de neutrófilos para a eliminação das UPEC (citado por Sivick & Mobley, 2010). Estas células têm a capacidade de reconhecer antígenos sem processamento prévio, e secretar IFN- γ em resposta, o que por sua vez, leva à estimulação de macrófagos (Tizard, 2004).

O tipo de fímbrias expressas pelas UPEC, parece influenciar o tipo de quimiocinas secretadas. Por exemplo, células renais expostas a fímbrias tipo-1 secretam quimiocinas associadas a neutrófilos, enquanto células estimuladas pelas fímbrias P secretam quimiocinas que têm como alvos células apresentadoras de antígenos e citocinas específicas para células Th1 (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Relativamente a células apresentadoras de antígenos no contexto da ITU ainda pouco se sabe (Sivick & Mobley, 2010). Num trabalho realizado por John e Nelson (2007), foram estudadas CD⁺ renais, onde se verificou que estas células estão em comunicação com todo o parênquima renal, residem numa forma imatura nos tecidos periféricos, constantemente em vigilância e respondendo a estímulos ambientais.

As CDs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) nos microrganismos. Após o reconhecimento de um patógeno, os receptores de reconhecimento do padrão ligam-se ao patógeno e este é fagocitado. As CDs então migram para tecidos linfóides secundários onde, na forma madura, apresentam o antígeno a células T, em que a activação destas últimas é crítica para a iniciação e regulação de uma resposta imunitária efectora específica (Willey *et al.*, 2008). Assim, as células dendríticas imaturas, ao encontrarem antígenos juntamente com lesões tissulares ou inflamação, tornam-se activadas e maturam-se rapidamente. Esta activação ocorre em resposta a moléculas produzidas pelo tecido lesado ou pelo microrganismo invasor. Deste modo, os tecidos inflamados libertam elevadas quantidades de sulfato de heparano solúvel, o qual se liga aos TLR-4, activando-as. Esta activação também pode ser desencadeada por defensinas produzidas por neutrófilos, e por outras moléculas como o TNF- α e a IL-1, e produtos microbianos, como o LPS e ácido desoxirribonucleico (*desoxyribonucleic acid*, DNA) bacteriano (Tizard, 2004).

A vigilância pelas CDs renais é efectuada através de diversos mecanismos: expressão à superfície de vários tipos de receptores, como por exemplo, TLR, receptores Fc, receptores do complemento, entre outros; contacto ou recepção de sinais parácrinos produzidos por células imunitárias inatas em circulação como neutrófilos, células *natural killer*, linfócitos T *natural Killer* e células T $\gamma\delta$; contacto ou recepção de sinais parácrinos produzidos por células imunitárias adquiridas em circulação; e contacto ou recepção de sinais produzidos por CDs renais residentes (citado por John & Nelson, 2007).

A rápida integração dos estímulos externos pelas CDs renais e a subsequente activação pró-inflamatória, pode iniciar e amplificar a resposta imunitária inata, principalmente através da secreção de citocinas (IL-2, IL-12, IL-15, IFN- γ , entre outras) e quimiocinas que actuam nas células renais adjacentes e células imunitárias inatas (Münz *et al.*, 2005).

Além da sua função na resposta imunitária inata, as CDs renais exibem características de células apresentadoras de antígeno do sistema imunitário adquirido. Estas células sondam o ambiente que as rodeia e capturam moléculas *self* e não-*self*, por fagocitose, pinocitose ou endocitose mediada por receptores. Elas expressam o Complexo Maior de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) I e II à sua superfície (Willey *et al.*, 2008), e quando activadas, apresentam poucos receptores para quimiocinas inflamatórias, receptores Fc e de manose, mas aumentam a expressão de moléculas do MHC classe II (citado por Sozzani, 2005), aumentam a expressão de moléculas co-estimulatórias à sua superfície e a endocitose é reduzida (Tizard, 2004).

Em resposta a sinais que invocam respostas imunitárias inatas, as CDs renais migram, através dos aferentes linfáticos para tecidos linfóides secundários levando moléculas capturadas para processamento e apresentação a células do sistema imunitário adquirido (citado por Sozzani, 2005). Está descrito (Tizard, 2004) que as células dendríticas são as

únicas células apresentadoras de antígenos capazes de activar células T que nunca tiveram contacto com o antígeno, e assim, são essenciais para iniciar uma resposta imunitária primária.

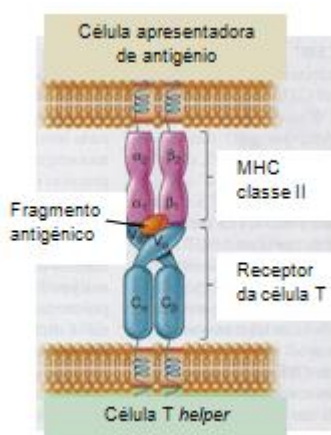
As células dendríticas maduras estimulam a proliferação de linfócitos T, e, dependendo da natureza do estímulo que lhes induziu a maturação, secretam citocinas que promovem a diferenciação de linfócitos T na direcção de células T-helper efectoras específicas (Th1, Th2 ou Th17) (Münz *et al.*, 2005). Moléculas derivadas dos microrganismos invasores, como o LPS, levam as CDs a estimular as células T na direcção Th1. A fagocitose de células apoptóticas infectadas realizada pelas CD é o evento chave necessário para que as CD secretem as citocinas necessárias para o desenvolvimento das Th17, e tanto as CD como as células apoptóticas infectadas estão presentes na bexiga durante a ITU (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Além das células dendríticas, parece existir uma população de macrófagos residentes na parede da bexiga, que aumentam grandemente a magnitude da resposta à ITU. Além disso, em resposta à infecção por UPEC, são também recrutados monócitos que podem dar origem a macrófagos e células dendríticas (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Quando os monócitos se deslocam para os tecidos inflamados, eles aumentam a produção de enzimas lisossómicas, aumentam a sua actividade fagocítica, aumentam a expressão de receptores para anti-corpos e complemento e aumentam também a secreção de proteases. As citocinas produzidas por estes macrófagos activados, especialmente o TNF- α e a IL-12, activam uma população de leucócitos, denominados células *natural killer*. Estas, por sua vez, secretam IFN- γ que activa ainda mais os macrófagos (Tizard, 2004).

As células T são activadas pelos antígenos apresentados pelo MHC classe II nas células apresentadoras de antígenos (CDs, macrófagos, células B) (Figura 4), que depois se diferenciam em células Th1 ou Th2. As células Th1 promovem a actividade dos linfócitos T

Figura 4 - Apresentação do antígeno no complexo maior de histocompatibilidade classe II na célula apresentadora de antígenos, à célula Th, através do seu receptor (adaptado de Willey *et al.*, 2008)



citotóxicos (Tc), activam macrófagos, e regulam a inflamação através da produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α . Por sua vez, as células Th2 tendem a estimular respostas mediadas por anticorpos, pela produção de citocinas como IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Willey *et al.*, 2008).

Apesar da existência de uma lacuna no que diz respeito às respostas mediadas por células T à ITU, há evidência da eliminação das UPEC por mecanismos mediados por anticorpos. Foram detectados anticorpos específicos contra UPEC na urina de humanos infectados e na urina e plasma de

animais expostos aos antígenos das UPEC, e foi comprovado que a IgG e a IgA urinárias de pacientes com ITU são capazes de inibir a aderência das UPEC. Estudos em pacientes também sugeriram que a resposta humoral à pielonefrite é, no geral, mais intensa e duradoura, que a resposta humoral à cistite. Como já referido anteriormente, a IgA urinária pode ter um papel na eliminação das UPEC da mucosa da bexiga. A IgG pode ser um marcador para troca de classe por células B, ou pode também ter uma acção directa na eliminação das bactérias da mucosa (citado por Sivick & Mobley, 2010).

Assim, a infecção por UPEC determina respostas humorais em modelos animais e humanos, em que tanto a IgG como a IgA-secretora são encontradas na urina e actuam como anticorpos neutralizantes (citado por Thumbikat, Waltenbaugh, Schaeffer & Klumpp, 2006).

Num estudo realizado por Thumbikat *et al.* (2006) foi demonstrado que a infecção inicial no rato leva a uma resposta humoral sistémica significativa, que está bem desenvolvida aos 14 dias pós-infecção. Num segundo encontro com a UPEC a resposta humoral não aumenta significativamente, mas existe a possibilidade de haver um aumento da afinidade dos anticorpos, como geralmente ocorre após estimulação antigénica repetida.

Nesse mesmo estudo, realizado em ratos, constatou-se que o hospedeiro é capaz de iniciar uma resposta imunitária adquirida que inclui a activação e recrutamento de células T para a bexiga e a produção de anticorpos específicos. Foi também demonstrado que essa resposta adquirida é suficiente para proteger o hospedeiro contra subseqüentes infecções. A reinfecção dos ratinhos com UPEC leva a uma eliminação rápida das bactérias da bexiga, em que a exposição inicial ao antígeno resulta numa resposta mais intensa e efectiva em reinfecções posteriores (Thumbikat *et al.*, 2006).

Apesar de grande parte do infiltrado inflamatório inicial ser constituído por neutrófilos, esse estudo demonstrou que, em infecções secundárias, há o recrutamento de linfócitos B e T, incluindo células CD4⁺ e CD8⁺, para a parede da bexiga (Thumbikat *et al.*, 2006). A molécula CD4 é encontrada em células Th, as quais reconhecem o antígeno exógeno processado pelas células apresentadoras de antígeno, e constitui um receptor para as moléculas do MHC tipo II dessas células (Tizard, 2004). A molécula CD8, em contraste, só é encontrada em células citotóxicas e constitui um receptor para moléculas do MHC tipo I. Deste modo, as UPEC que invadem e persistem nas células uroepiteliais, podem ser alvos para as células T CD8⁺ através da sua actividade citotóxica, enquanto as UPEC extracelulares podem ser removidas por mecanismos dependentes das células T CD4⁺. Nesse estudo foi também demonstrado que na activação de células T, a qual se inicia a partir dos 5 dias pós-infecção, há proliferação dessas células em resposta a um antígeno específico *in vitro* (Thumbikat *et al.*, 2006).

Na resposta à ITU também estão envolvidas células B-1 e células T *natural killer*, as quais residem em locais específicos do corpo e possuem receptores relativamente invariantes (citado por Sivick & Mobley, 2010).

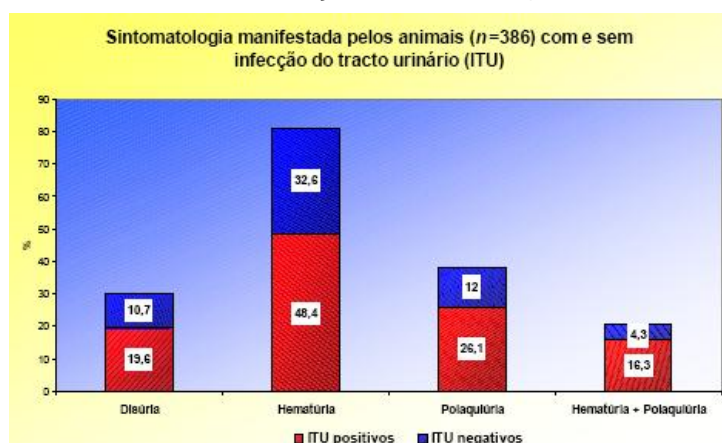
As células T *natural killer* podem actuar como amplificadores precoces da resposta imunitária inata à ITU, através da secreção de citocinas (citado por Sivick & Mobley, 2010).

As células B-1 secretam espontaneamente grandes quantidades de IgM contra antígenos bacterianos, e em contraste com as células B convencionais (B-2), não necessitam de ajuda pelas células T (citado por Sivick & Mobley, 2010). A sua estimulação é realizada por LPS bacteriano e anticorpos contra outros anticorpos, por exemplo. Como não existe ajuda pelas células T, estas células B não conseguem alterar a sua produção de anticorpos, e não são formadas células B de memória (Willey *et al.*, 2008).

II.1.3. SINAIS CLÍNICOS

Quando o agente uropatogénico ultrapassa todos os mecanismos de defesa do hospedeiro e causa ITU, clinicamente esta pode ser sintomática ou assintomática. A ITU inferior geralmente está associada a sinais clínicos, que podem compreender polaquiúria, estrangúria ou disúria, e hematúria. No caso de o animal desenvolver uma ITU exclusivamente superior (Graver, 2003), pode haver hematúria (Bartges, 2007), dor localizada a um ou ambos os rins, insuficiência renal (e os sinais daí provenientes, se ambos os rins estiverem infectados) (Bartges, 2005) e o animal pode demonstrar sinais inespecíficos de doença sistémica (letargia, depressão, anorexia, febre) os quais geralmente

Figura 5 - Sinais mais frequentes nos animais com infecção do tracto urinário (reproduzido com autorização: Féria, 2001)



estão ausentes numa ITU inferior (Graver, 2003). Segundo um estudo realizado por Féria (2001), os sinais mais frequentes e indicativos de ITU são polaquiúria e hematúria (Figura 5).

Os sinais clínicos associados a ITU dependem da interacção de diversos factores: virulência e número de agentes uropatogénicos, presença ou ausência de causas predisponentes, resposta compensatória do organismo à infecção, duração da infecção e local ou locais da infecção (Bartges, 2005).

Geralmente, os resultados de análises sanguíneas são normais, excepto no caso de existência de septicemia ou insuficiência renal (no caso de haver pielonefrite bilateral) (Bartges, 2005).

II.1.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de ITU é, frequentemente, feito apenas com base na história clínica e exame físico do animal. No entanto, é recomendado fazer urianálise, urocultura e teste de susceptibilidade aos antibióticos (TSA), principalmente se esta foi uma recidiva e o tratamento anterior não foi eficaz (Senior, 2006).

Para se obterem resultados válidos a amostra tem de ser colhida e manipulada de modo apropriado. As amostras devem ser colhidas antes de qualquer tratamento ser iniciado, para qualquer recipiente limpo, ou no caso de se ir realizar urocultura, para recipiente estéril. Existem várias formas de colher a amostra: por colheita livre, algaliação e cistocentese. O primeiro constitui o método mais fácil, mas que produz a amostra menos desejável, porque pode haver contaminação desta com a flora existente na uretra distal, vulva ou prepúcio (Sirois, 2007b).

Quando se colhe urina por algaliação da bexiga também há a possibilidade de contaminação da amostra com a flora existente na uretra distal e que é transportada ascendentemente pelo cateter. No entanto, a amostra colhida por este método pode ser utilizada para urocultura e TSA se a cistocentese não for possível de realizar (Sirois, 2007b). O melhor método para colheita de urina quando se avalia um animal para a existência de ITU é a cistocentese (Bartges, 2005). Esta pode ser eco-guiada se necessário, e permite colher amostras estéreis (Sirois, 2007b).

II.1.4.1. URIANÁLISE

A urianálise é um procedimento de diagnóstico simples, rápido e pouco dispendioso que pode fornecer informações importantes ao médico veterinário (Sirois, 2007a) e que deve ser realizada como rotina (Bartges, 2005). Com ITU a gravidade específica da urina é variável, podendo ser normal ou, se a urina estiver diluída, isso pode ser um factor de risco para o desenvolvimento de ITU, ou uma consequência de uma ITU superior (Bartges, 2007). As tiras de análise de urina frequentemente indicam hematúria e proteinúria, mas relativamente aos leucócitos e aos nitritos, elas não são fiáveis nos cães e gatos e por isso não devem ser utilizadas para avaliar estes parâmetros (Bartges, 2005). Entre 3 a 16% dos cães e gatos com resultados normais na avaliação física e química na urianálise, podem ter alterações importantes no sedimento (DiBartola, 2005). Assim, o exame microscópico do sedimento é uma parte importante da urianálise, que deve ser sempre realizado (Bartges, 2005). A presença de alguns eritrócitos e leucócitos no sedimento é normal, mas quando existe um excesso destas células estamos perante hematúria, que pode ser macroscópica e/ou

microscópica, ou leucocitúria, respectivamente. A existência de algumas células epiteliais de descamação também é comum na análise de amostras de urina colhidas por jacto livre ou algaliação, e tem baixo significado. Ocasionalmente células de transição também são normais, mas em números mais elevados pode estar presente infecção, irritação ou neoplasia do tracto urinário. Um outro parâmetro incluído na análise microscópica do sedimento é a existência de cilindros, os quais são constituídos por proteínas ou células agregadas, com origem nos túbulos renais, mais especificamente no ramo ascendente da ansa de Henle. Quando se observam cilindros celulares (cilindrúria) e estes são formados por leucócitos, eritrócitos (os quais são muito frágeis e raramente observados) ou células do epitélio renal, podemos estar na presença de pielonefrite. Num indivíduo normal, a urina contida na bexiga é estéril, no entanto, como a uretra distal e o tracto genital contêm bactérias, as amostras colhidas por jacto livre ou algaliação podem ser contaminadas, mas esta contaminação geralmente não resulta em quantidade suficiente de bactérias para serem visualizadas ao microscópio. Para estes organismos serem visualizados ao microscópio, eles devem existir numa quantidade superior a 10000 bastonetes por mililitro ou 100000 cocos por mililitro de urina (DiBartola, 2005). A presença de um número significativo de leucócitos associada a hematúria e proteinúria, sugere inflamação. Quando existe microburia com leucocitúria, isto indica inflamação activa associada com infecção. No entanto, se existir um comprometimento das defesas do hospedeiro, pode existir ITU, especialmente a ITU bacteriana, sem inflamação concorrente (Bartges, 2005). A ausência de bacteriúria no exame do sedimento não exclui a presença de uma ITU, como Torres *et al.* (2005) referiu no seu estudo, em que 24% das amostras que revelaram crescimento bacteriano na urocultura, não foi identificada bacteriúria. Fica assim demonstrado que a urianálise *per si* não é suficiente para detectar ITUs, pelo que a suspeita de ITU deve ser confirmada com urocultura, a qual constitui o *gold standard* para o diagnóstico de ITU (Bartges, 2005).

II.1.4.2. UROCULTURA E IDENTIFICAÇÃO

Os resultados obtidos na urocultura, também aqui dependem do método de colheita da amostra, e para se concluir a presença de uma ITU têm de ser relacionados com outros parâmetros, como piúria, quadro clínico e bacteriúria significativa, tal como indicado na Tabela 3. A urocultura quantitativa permite determinar o número de unidades formadoras de colónias (UFC) que crescem em 1 mililitro de urina (UFC/ml).

Idealmente, a urocultura deve ser realizada dentro de 30 minutos após a colheita, mas se isso não for possível, a amostra pode ser refrigerada até 6 horas após a colheita, sem perda significativa do crescimento bacteriano (DiBartola, 2005).

Tabela 3 – Interpretação dos dados laboratoriais e clínicos para o diagnóstico da ITU no cão (reproduzido com autorização: Pomba, 2004)

Método de colheita	Bacteriúria (UFC/ml)	Piúria	Quadro clínico de ITU	Bacteriúria significativa	Diagnóstico de ITU
Colheita livre	$\geq 10^5$	>5	Presente	+	ITU
	$< 10^5$	Variável	Ausente	-	Negativo
Cateterismo	$\geq 10^5$	>5	Presente	+	ITU
	10^3 - 10^4	>5	Presente	+	ITU
	$< 10^3$	Variável	Ausente	-	Negativo
Cistocentese	$\geq 10^5$	>5	Presente	+	ITU
	10^3 - 10^4	>5	Presente	+	ITU
	$< 10^3$	Variável	Ausente	-	Negativo

Se a urocultura tiver resultado positivo após 24 horas de incubação, e há diagnóstico positivo de ITU, deve ser feita a identificação do agente uropatogénico e determinada a sua susceptibilidade aos antibióticos (Bartges, 2007).

Após o isolamento bacteriano na urocultura, pode-se proceder à coloração Gram de uma colónia e observação da morfologia das bactérias ao microscópio, e realização de painéis bioquímicos (Figura 6) para identificação do agente patogénico.

Figura 6 - Api 20 E, exemplo de painel bioquímico



II.1.4.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS (TSA)

Diversos factores devem ser tidos em consideração quando se escolhe o agente antimicrobiano que se vai utilizar. Estes incluem, a natureza da infecção, a identidade e susceptibilidade do agente patogénico, a farmacocinética do fármaco escolhido na espécie animal alvo, a farmacodinâmica do fármaco no local de infecção, características do hospedeiro (isto é, local e natureza da infecção e toxicidade para o hospedeiro), o custo, a facilidade de utilização e a via e a frequência de administração.

Tradicionalmente, os resultados destes testes são reportados qualitativamente e/ou quantitativamente. Quando os resultados são qualitativos, eles são reportados como “susceptível”, “intermédio” ou “resistente”, enquanto os resultados quantitativos são reportados como concentração inibitória mínima em µg/ml ou mg/ml.

O alvo da antibioterapia é a bactéria que está a causar o processo infeccioso. Os agentes antimicrobianos para uso clínico são seleccionados tendo em conta a sua toxicidade

selectiva para os agentes patogénicos e efeito negligenciável nos animais. No entanto, nem todas as bactérias patogénicas, mesmo as da mesma espécie, são igualmente susceptíveis ao agente antimicrobiano. Além disso, a susceptibilidade de uma população bacteriana pode alterar-se ao longo do tempo, especialmente se houver exposição repetida ou continuada a agentes antimicrobianos. Assim, a variabilidade em susceptibilidade das bactérias patogénicas aos antibióticos disponíveis pode ser determinada sujeitando os agentes patogénicos a testes de susceptibilidade aos antibióticos *in vitro*, em que a capacidade de estes predizer a eficácia do antibiótico, depende se o teste é realizado de forma correcta.

Sempre que a susceptibilidade de um agente patogénico não é previsível com base na experiência do clínico, quando é necessária a identificação do patógeno, ou é necessária ajuda na escolha do melhor agente antimicrobiano a usar, deve-se realizar um TSA.

Apesar de estes testes auxiliarem muito, é necessário ter em conta que os TSAs são testes estáticos, realizados sob condições padronizadas, ao contrário do ambiente *in vivo* de onde o agente patogénico foi isolado, onde nada é padronizado ou estático, como por exemplo, o pH, a tensão de Oxigénio, a concentração de bactérias ou a capacidade de o fármaco se difundir para o local de infecção. Assim, os resultados gerados *in vitro* nem sempre podem ser aplicados devido a uma variedade de factores associados com o agente antimicrobiano, o hospedeiro, ou o agente patogénico.

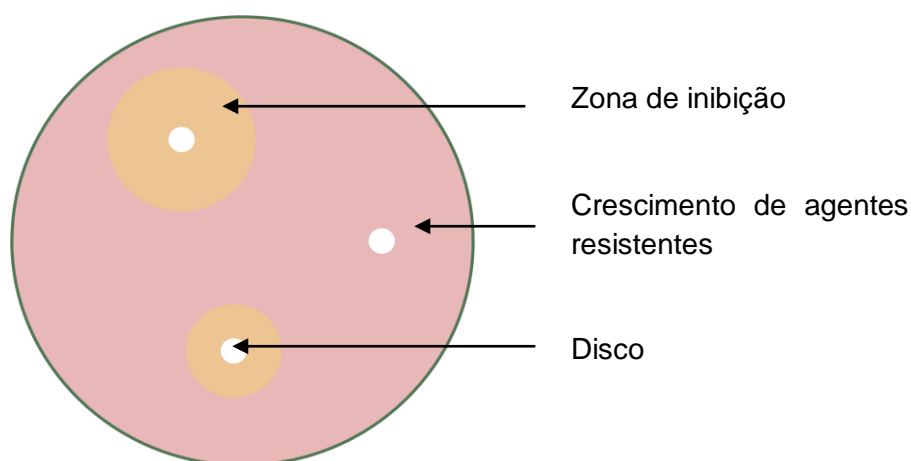
Existem vários métodos para testar a susceptibilidade das bactérias aos antibióticos, em que estes métodos utilizam a inibição da bactéria e não a sua morte. Os métodos mais utilizados em Medicina Veterinária são o de difusão em disco e o de microdiluição.

O teste de difusão em disco é o método mais utilizado em Medicina Veterinária devido à sua flexibilidade relativamente ao tipo e número de fármacos que podem ser testados, e ao seu baixo custo relativo. Este método baseia-se na difusão do agente antimicrobiano a partir de um disco, que geralmente foi preparado comercialmente e por isso tem características padronizadas. Este disco é colocado na superfície de um meio de cultura (com uma espessura recomendada de 4mm), geralmente o agar de Mueller-Hinton, o qual foi previamente semeado com aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ a partir de uma cultura pura, e é posto a incubar a 37°C durante 24 horas.

Quando o disco é colocado sobre o meio de cultura, ocorre a difusão do agente antimicrobiano nele incorporado, o que resulta num gradiente de concentração, e quando esta concentração se torna demasiado baixa para inibir o crescimento das bactérias, forma-se a zona de inibição (Figura 7). Isto significa que quanto maior for a zona de inibição, menor é a concentração necessária desse antibiótico para inibir o crescimento do agente patogénico.

A maior desvantagem deste teste é que os resultados são qualitativos, reportando apenas os agentes patogénicos como sensíveis, intermédios ou resistentes (Walker, 2006).

Figura 7 – Esquema de método de difusão em disco (adaptado de Walker, 2006)



Ao conhecer de que modo a bactéria testada é susceptível ao agente antimicrobiano, permite ao Médico Veterinário, em algumas situações, ajustar a dose de forma a reduzir custos, reduzir o potencial de toxicidade ou aumentar a morte das bactérias. Assim, foram desenvolvidos vários testes quantitativos (Walker, 2006).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é considerada o *gold standard* para a determinação da susceptibilidade de organismos a antibióticos, e por isso, também é utilizada para avaliar a performance de outros testes de susceptibilidade. Esta é usada em laboratórios para confirmar resistências pouco comuns, para dar uma resposta definitiva acerca de um resultado dúbio obtido por outro método de testagem, ou quando o método por difusão em disco não é adequado (Andrews, 2001).

A determinação da CIM pelo método de microdiluição está a ser usada em Medicina Veterinária com cada vez mais frequência. Apesar das vantagens sobre os anteriores, estes testes são mais dispendiosos que os de difusão em disco e não têm a mesma flexibilidade de escolha de antibióticos como os anteriores (Walker, 2006).

Para a realização de um teste de microdiluição, é feita uma suspensão bacteriana a partir de uma cultura fresca, a qual é diluída para ficar com uma concentração de aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/ml. Esta suspensão é então inoculada no tabuleiro de microdiluição que contém diluições seriadas dos agentes antimicrobianos a serem testados. Uma vez inoculados, estes tabuleiros são colocados a incubar numa estufa a cerca de $35-37^\circ\text{C}$, durante 16 a 20 horas. Estes tabuleiros de microdiluição podem ser preparados no laboratório onde vão ser utilizados ou podem ser adquiridos comercialmente. Existem dois tipos de *kits* comerciais: desidratados, os quais podem ser armazenados durante 1 a 2 anos à temperatura ambiente; e os congelados, que devem ser armazenados a temperaturas entre os -10°C e os -70°C , durante 6 meses dependendo dos agentes antibacterianos presentes (Walker, 2006).

Após a incubação na estufa, procede-se à leitura dos resultados. Esta é realizada à vista desarmada após o período de incubação, e a CIM consiste na menor concentração do fármaco que inibe completamente o crescimento do agente patogénico isolado.

Os resultados obtidos por testes *in vitro*, quer tenham sido determinados por métodos de difusão ou diluição, são fornecidos aos clínicos classificando o agente patogénico apenas como “sensível”, “intermédio” ou “resistente” aos vários antimicrobianos testados. Estas designações são determinadas com base em *breakpoints in vitro*. Isto significa que, quando um laboratório refere que um organismo é susceptível a um antimicrobiano, as concentrações plasmáticas ou tissulares desse agente antimicrobiano vão ser suficientes para inibir o crescimento bacteriano *in vivo*, quando ele é administrado pela via e na dose recomendadas (aprovada pela Food and Drug Administration). Por sua vez, os *breakpoints* são necessários para uma correcta interpretação clínica dos resultados fornecidos pelos testes quantitativos ou qualitativos.

Os testes *in vitro* envolvem a exposição de uma quantidade relativamente pequena de bactérias a um nível constante do agente antimicrobiano, sob condições padronizadas, e em que estas condições diferem muito das condições *in vivo* de onde o agente patogénico foi isolado. Por isso, quando a antibioterapia falha, há várias causas possíveis: os resultados do TSA foram incorrectos (provavelmente devido a erro durante o teste), houve selecção incorrecta do fármaco, da dose, ou da via de administração, ou as defesas do hospedeiro ou o seu sistema imunitário estavam muito comprometidos (Walker, 2006).

II.1.5. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS

O tratamento de infecções bacterianas é muitas vezes complicado pela capacidade de o agente bacteriano desenvolver resistência aos fármacos antimicrobianos (Tenover, 2006).

A perda de eficácia através da emergência e disseminação de resistência (definida como a capacidade do microrganismo ultrapassar o efeito de uma concentração normal de um fármaco antimicrobiano) aos fármacos antibacterianos é reportada frequentemente. A frequência com que estes novos fenótipos resistentes surgem é problemática, já que infecções causadas por bactérias resistentes estão associadas a maior morbidade e mortalidade do que as causadas por agentes patogénicos susceptíveis (Boerlin & White, 2006).

As bactérias podem manifestar resistência a fármacos antimicrobianos através de uma variedade de mecanismos (Tenover, 2006).

A introdução de novas classes de fármacos antibacterianos ou a modificação das já existentes tem sido acompanhada pelo desenvolvimento sistemático de novos mecanismos de resistência bacteriana. Deste modo, a utilização correcta dos antimicrobianos actuais e o

desenvolvimento contínuo de novos fármacos são vitais para a protecção da saúde humana e animal contra as doenças infecciosas (Boerlin & White, 2006).

A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca, pode resultar de mutação e selecção, ou pode ser adquirida através da transferência de factores de resistência entre organismos. Uma população bacteriana inteira pode adquirir resistência pela transferência genética após uma única administração de antibiótico.

O fenómeno do factor R tem sido identificado em bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, *Enterobacter*, entre outras. Este fenómeno é conhecido por conferir resistência a penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas e trimetoprim (Graver, 2003).

Algumas espécies de bactérias têm resistência inata ou intrínseca a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos, e nesses casos, todas as estirpes dessas espécies bacterianas são resistentes a todos os membros dessa classe de fármacos (Tenover, 2006), como por exemplo, as bactérias gram-negativas, as quais são naturalmente resistentes à actividade dos antibióticos macrólidos, já que as moléculas deste grupo são demasiado grandes para atravessar a parede celular e ter acesso ao espaço citoplasmático onde exercem a sua função (Boerlin & White, 2006).

De maior preocupação são os casos de resistência adquirida, onde populações inicialmente susceptíveis a determinados agentes antimicrobianos, se tornam resistentes e proliferam e disseminam sob a pressão selectiva do uso desses fármacos. Assim, diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos são rapidamente difundidos entre vários géneros bacterianos (Tenover, 2006).

Esta resistência adquirida, geralmente ocorre através de alterações genéticas num organismo normalmente susceptível. Este tipo de resistência pode ser a apenas um agente antimicrobiano, a alguns mas não a toda uma classe, a toda uma classe de antimicrobianos ou até a vários antimicrobianos de diferentes classes (Boerlin & White, 2006).

As bactérias desenvolveram mecanismos genéticos e bioquímicos para resistir à acção destes fármacos antimicrobianos (McManus, 1997).

Os mecanismos genéticos incluem mutação e aquisição de DNA novo. As bactérias podem resistir aos antimicrobianos bioquimicamente por vários mecanismos:

- pela inactivação dos fármacos com β -lactamases, acetilases, adenilases e fosforilases (McManus, 1997) que destroem o agente antimicrobiano antes de este ter efeito (citado por Tenover, 2006); reduzindo o acesso do fármaco aos seus locais de acção devido a características da membrana (McManus, 1997), que podem deixar de expressar os locais de ligação a determinados agentes antimicrobianos (citado por Tenover, 2006)
- ou as bactérias podem adquirir mutações que limitam o acesso dos agentes antimicrobianos ao seu alvo intracelular através da diminuição da expressão de genes para as porinas (citado por Tenover, 2006); ultrapassando o metabolismo do fármaco; e desenvolvendo tolerância (McManus, 1997).

Além destes mecanismos, as bactérias podem adquirir bombas de efluxo que expõem o agente antimicrobiano da célula antes de ele atingir o seu alvo e exercer o seu efeito (Tenover, 2006).

As bactérias também podem desenvolver resistências pela aquisição de material genético novo proveniente de outros microrganismos resistentes, em que este fenómeno é designado de evolução horizontal, e pode ocorrer entre estirpes da mesma espécie ou entre bactérias de diferentes géneros ou espécies. Estes mecanismos incluem conjugação, transdução e transformação, em que transposições facilitam a transferência e incorporação dos genes de resistência no genoma do hospedeiro ou em plasmídeos. As bactérias gram-negativas, durante a conjugação fazem a transferência de plasmídeos contendo os genes de resistência para células adjacentes, geralmente através de pilus que unem os dois organismos (citado por Tenover, 2006).

Deste modo, populações normalmente susceptíveis podem tornar-se resistentes a fármacos antimicrobianos através de mutação e selecção, ou pela aquisição de informação genética que codifica a resistência a partir de outras bactérias (citado por Tenover, 2006).

A aquisição de determinantes genéticos de resistência está associada a alterações na CIM, mas nem sempre leva manifestações clínicas. Deste modo, a determinação da CIM no lugar da classificação qualitativa em resistente ou sensível, é preferida (Boerlin & White, 2006).

Como já referido anteriormente, a *E. coli* constitui o maior agente uropatogénico de infecções do tracto urinário em cães. Nos últimos anos tem havido um aumento das suas resistências aos antimicrobianos em isolados de animais, nomeadamente às fluoroquinolonas, incluindo as associadas com multi-resistências (citado por Shasheen, Wang, Johnson, Kaltenboeck & Boothe, 2009).

Os mecanismos mais comuns de resistência a quinolonas na *E. coli* são mutações na DNA girase (topoisomerase II, gene *gyrA*) e na topoisomerase IV (gene *parC*). Outros mecanismos que também podem contribuir para estas resistências são bombas de efluxo ou modificações nas porinas, que evitam concentrações intracelulares efectivas dos antimicrobianos (citado por Shasheen *et al.*, 2009).

Num estudo realizado no Western College of Veterinary Medicine sobre resistências antimicrobianas de uropatógenos (Ball *et al.*, 2008), concluiu-se que o número de antimicrobianos aos quais a *E. coli* recorrente era resistente aumentou significativamente durante o estudo, enquanto na *E. coli* não recorrente o número de antimicrobianos aos quais a bactéria foi resistente não aumentou.

A *E. coli* é, frequentemente, resistente a aminopenicilinas, como a amoxicilina ou a ampicilina, e a cefalosporinas, e essa resistência é tipicamente mediada pela aquisição de plasmídeos que codificam β -lactamases, como a TEM-1, TEM-2 ou SHV-1, que hidrolizam e inactivam estes fármacos (Paterson, 2006). Num estudo realizado em Portugal, no qual foram testados diversos antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilinas e cefalosporinas,

contra várias estirpes uropatogénicas de *E. coli*, verificou-se a existência de uma elevada frequência de resistência a alguns desses antibióticos, incluído à cefamicina Cefoxitina (Pomba, Delgado, Peixoto, Costa & Correia, 2007). Esta resistência contra as cefamicinas pode ocorrer como resultado de alterações nas porinas (citado por Tenover, 2006).

Algumas estirpes de *E. coli* desenvolvem resistência a cefalosporinas de 3ª geração e monobactams, pela aquisição de β -lactamases de espectro alargado (*Extended spectrum β -lactamases*, ESBLs), as quais não são activas contra cefamicinas, como a cefoxitina e o cefotetan (citado por Tenover, 2006), nem contra os carbapenemos (Paterson, 2006). Além da *E. coli*, as ESBLs são detectadas com maior frequência também na *Klebsiella pneumoniae*. Esses plasmídeos que contêm os genes que codificam as ESBLs, contêm determinantes de resistência para outras classes de agentes antimicrobianos, e são prontamente transmissíveis entre estirpes e entre diferentes espécies de bactérias gram-negativas (Paterson, 2006).

Os genes que codificam as ESBLs são frequentemente, encontrados nos mesmos plasmídeos que codificam resistência contra aminoglicosídeos e sulfonamidas, e várias espécies de *Enterobacteriaceae* possuem alterações que conferem alto nível de resistência contra quinolonas (Paterson, 2006).

Já foram identificadas *E. coli* produtoras de ESBLs em cães, isoladas de feridas, corrimento prepucial e urina. Esses isolados mostraram resistência a cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª geração, quinolonas, macrólidos, aminoglicosídeos, clindamicina e a uma sulfonamida, e eram sensíveis ao imipenem e em alguns casos, à tobramicina (Steen & Webb, 2007).

A resistência contra quinolonas entre as *Enterobacteriaceae* é, geralmente, o resultado de mutações cromossómicas que levam a alterações nas enzimas alvo ou na acumulação do fármaco. No entanto, tem sido reportada resistência mediada por plasmídeos em estirpes de *Klebsiella spp.* e *E. coli* (Paterson, 2006).

Num estudo recente sobre resistência *in vitro* a fluoroquinolonas na *E. coli* e na *Klebsiella spp.* para a levofloxacina só foram encontradas alterações no gene *gyrA*, enquanto para a ciprofloxacina já foram encontradas alterações no gene *gyrA* e também no *parC*, o que significa que a resistência à levofloxacina durante o tratamento pode desenvolver-se mais lentamente relativamente a outras fluoroquinolonas, já que são necessárias múltiplas mutações no *gyrA* e/ou *parC* para haver resistência às fluoroquinolonas na *E. coli* (Drago, Nicola, Mattina & De Vecchi, 2010).

Também nos *Staphylococcus*, mutações no *parC* são frequentemente encontradas em isolados resistentes a quinolonas, e alterações únicas neste gene parecem ser suficientes para causar resistência clínica (ou seja, concentrações inibitórias que excedem os *breakpoints* de susceptibilidade dos laboratórios) à ciprofloxacina, mas não necessariamente a outras fluoroquinolonas mais potentes (citado por Hooper, 2002). A resistência às fluoroquinolonas ocorre por mecanismos semelhantes nos patógenos gram-positivos

estudados, em que o contributo principal para essa resistência provém das mutações cromossómicas espontâneas que causam alterações nas enzimas alvo dos fármacos. A contribuição dos mecanismos de efluxo não está bem definida (Hooper, 2002).

Estratégias para contornar a resistência bacteriana incluem a utilização de doses apropriadas dos fármacos e/ou o uso de combinações sinérgicas, particularmente nas infecções mais complicadas. Assim, o uso de terapêuticas combinadas pode ser uma boa estratégia para limitar a ocorrência de resistências, como por exemplo, a combinação de fluoroquinolonas com β -lactâmicos que limita a ocorrência de resistência em *E. coli* produtoras de ESBLs (Drago *et al.*, 2010).

A grande maioria das *Enterobacteriaceae*, incluindo as produtoras de ESBLs, continua susceptível aos carbapenemos (Paterson, 2006).

As infecções causadas por *Stenotrophomonas maltophilia* são particularmente difíceis de tratar porque, frequentemente, os isolados clínicos são resistentes a muitos agentes antimicrobianos (Denton & Kerr, 1998), incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrólidos (Valdezate, Vindel, Loza, Baquero & Cantón, 2001). Dignas de registo são as resistências aos fármacos da classe dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenemos, devido à produção heterogênea de β -lactamases (Denton & Kerr, 1998).

A resistência intrínseca aos β -lactâmicos é, aparentemente, devido a duas enzimas, L1 e L2. Num estudo realizado, quando se eliminou a enzima L1, foi também eliminada a capacidade de hidrolizar o imipenem. Quando se eliminou a enzima L2, a capacidade de hidrolizar o imipenem manteve-se, assim como também se manteve a resistência às penicilinas, mas por outro lado, houve decréscimo da resistência a algumas cefalosporinas e monobactams. A eliminação das duas enzimas erradicou virtualmente a hidrólise do imipenem e deixou as bactérias virtualmente sensíveis a todos os β -lactâmicos (Zhang, Li & Poole, 2000).

Todos os aminoglicosídeos também mostraram actividade reduzida contra a *S. maltophilia* (Valdezate *et al.*, 2001), o que pode ser devido à produção de uma enzima (*aminoglycoside-modifying enzyme*) (Vila & Marco, 2010) e à expressão de sistemas de efluxo (citado por Valdezate *et al.*, 2001).

A doxiciclina mostrou maior actividade intrínseca que a tetraciclina, em que a frequência de resistência para a tetraciclina foi de 86%, enquanto para a doxiciclina foi inferior a 1%. Os macrólidos mostraram elevadas CIMs para a *S. maltophilia* (Valdezate *et al.*, 2001).

Num estudo recente (Gülmez, Çakar, Şener, Karakaya & Haşçelik, 2010), verificou-se que 96% dos isolados de *S. maltophilia* testados apresentavam resistência a diversos agentes antimicrobianos como, os β -lactâmicos, ciprofloxacina e colistina, e os agentes mais activos contra este agente patogénico foram a tigeciclina, a doxiciclina e o trimetoprim-sulfametoxazol.

A permeabilidade reduzida e a expressão de bombas de efluxo pode influenciar este fenótipo de resistência, e a transferência genética entre microrganismos gram-positivos e a

S. maltophilia pode explicar a evolução na direcção do fenótipo multi-resistente (citado por Valdezate *et al.*, 2001).

Há evidência de que as bombas de efluxo podem ser um factor contribuinte para a resistência intrínseca e adquirida da resistência a múltiplos fármacos da *S. maltophilia*, sendo que as bombas de efluxo são cada vez mais reconhecidas como um factor muito importante de resistência intrínseca e adquirida em vários patógenos em humanos, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa* (Zhang *et al.*, 2000). Na *S. maltophilia* são estas bombas de efluxo as responsáveis pela resistência às quinolonas (Vila & Marco, 2010).

Estudos anteriores detectaram a existência de integrões em isolados clínicos Gram-negativos, com plasmídeos ou transposões a contribuírem para a sua disseminação. No entanto, Chang, Chen, Chang, Lee e Wu (2004) apenas detectaram integrões de classe 1 em 22% dos isolados clínicos de *S. maltophilia*, e em que apenas um deles se localizava num plasmídeo. Este resultado sugere que no caso da *S. maltophilia*, os integrões e os plasmídeos não desempenham um papel muito importante na resistência.

Relativamente ao *Staphylococcus pseudintermedius*, desde a sua definição em 2005 (Devriese *et al.*, 2005) têm sido identificadas estirpes meticilina-resistentes (*Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*, MRSP) em animais de companhia através da detecção por *polymerase chain reaction* (PCR) do gene *mecA* (Ruscher *et al.*, 2009). Neste estudo, os testes de susceptibilidade aos antibióticos revelaram a presença de bactérias multi-resistentes contra a maioria dos antibióticos não- β -lactâmicos (fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrólidos), enquanto os resultados das CIMs para os β -lactâmicos diferiram muito entre os diversos isolados de MRSP, excepto para a oxacilina, em que todas as estirpes estudadas se mostraram resistentes (Ruscher *et al.*, 2009).

II.1.6. TRATAMENTO

A antibioterapia é o principal componente do tratamento da infecção urinária. No entanto, o estado do sistema imunitário do hospedeiro é o principal determinante do sucesso do tratamento.

O tratamento antimicrobiano deve controlar o crescimento dos agentes patogénicos durante o tempo suficiente para permitir que os mecanismos de defesa do hospedeiro sejam capazes de prevenir a colonização do tracto urinário sem a necessidade de mais administrações de antibiótico. Assim, é importante identificar os animais que possuem alterações do sistema imunitário ou doenças que sejam tratáveis e que predisponham ao desenvolvimento de ITU. Deste modo, deve ser realizado um exame físico completo a todos os animais com sinais de ITU, assim como, deve ser realizada urianálise e urocultura em todos os animais com suspeita de alterações no sistema imunitário (Graver, 2003).

Um tratamento antimicrobiano apropriado requer que o clínico tenha uma ideia do agente patogénico que pode estar envolvido no processo infeccioso, e conheça também a capacidade do antimicrobiano escolhido de atingir concentrações terapêuticas no local de infecção. No entanto, idealmente devem ser recolhidas amostras para cultura e testes de susceptibilidade aos antibióticos, para seleccionar o fármaco e a dose mais apropriados (Walker & Giguère, 2006).

A maioria dos agentes antimicrobianos usados no tratamento de infecções bacterianas pode ser categorizada de acordo com o seu mecanismo de acção, incluindo interferência com a síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, interferência com a síntese de ácido nucleico e inibição de reacções metabólicas (citado por Tenover, 2006) (Tabela 4).

Tabela 4 – Mecanismos de acção de alguns agentes antimicrobianos (adaptado de Tenover, 2006)

Mecanismo de acção	Agentes antimicrobianos
Interferência com a síntese da parede celular	β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams)
Inibição da síntese proteica <ul style="list-style-type: none"> • Ligação à subunidade ribossomal 50S • Ligação à subunidade ribossomal 30S 	Macrólidos, cloranfenicol, clindamicina Aminoglicosídeos, Tetraciclina
Interferência com a síntese de ácido nucleico <ul style="list-style-type: none"> • Inibição da síntese de DNA • Inibição da síntese de RNA 	Fluoroquinolonas Rifampin
Inibição de reacções metabólicas	Sulfonamidas
Interrupção da estrutura da membrana bacteriana	Polimixinas, daptomicina

Em algumas situações inicia-se o tratamento antimicrobiano antes da identificação do agente patogénico específico ou sem se conhecer a susceptibilidade aos antibióticos desse agente. A este processo dá-se o nome de antibioterapia empírica, o qual pode ser utilizado para o maneio inicial de infecções simples em pacientes imunocompetentes (Morais, 2009). Esta escolha do antimicrobiano deve ser guiada por resultados de estudos que identificam os microrganismos mais comuns em determinados locais de infecção, por considerações farmacodinâmicas, e pelo conhecimento do perfil de resistências para o agente patogénico esperado (Walker & Giguère, 2006). Por exemplo, bactérias *Staphylococcus*

pseudintermedius geralmente são susceptíveis a antibióticos com inibidores de beta-lactamases e a cefalosporinas de 1ª e 2ª geração.

Relativamente a bactérias gram-negativas, já não é possível prever a sua susceptibilidade com tanta segurança, mas a maioria das bactérias entéricas gram-negativas serão susceptíveis a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e cefalosporinas de 2ª ou 3ª geração (Morais, 2009). No entanto, o uso de fluoroquinolonas no tratamento empírico de ITU bacteriana é desencorajado devido à resistência inerente de muitas bactérias gram-positivas e ao desenvolvimento de resistências de muitas bactérias gram-negativas (Bartges, 2005).

Assim, na ITU, tendo em conta os microrganismos uropatogénicos mais frequentes, pode-se ter como primeira escolha a amoxicilina com ácido clavulânico ou as cefalosporinas, e como outras opções, as sulfonamidas, as fluoroquinolonas e as tetraciclina (Morais, 2009).

Como a maioria dos antimicrobianos atinge concentrações altas na urina como resultado da excreção renal, é possível obter um bom resultado num animal mesmo que o agente patogénico seja resistente ao antimicrobiano utilizado (Bartges, 2005).

A frequência de administração do antibiótico deve ser uma que permita manter concentrações inibitórias mínimas na urina (Polzin, 2007).

O fármaco ideal ao qual o agente patogénico é susceptível, atinge concentrações eficazes no local de infecção (a qual no caso de ITU, deve atingir uma concentração na urina quatro vezes superior à CIM (Kogika, 2009)), não é tóxico para o hospedeiro, induz o mínimo stress ao animal, sendo fácil de administrar, tem custos baixos e não afecta adversamente a flora intestinal do animal (Bartges, 2005).

No caso de uma ITU simples, deve-se ter em conta os microrganismos mais frequentemente encontrados (*E. coli*, *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp.*, *Proteus sp.p*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*) e se o animal não esteve sujeito a terapêutica antimicrobiana nas últimas 4 a 6 semanas. A escolha do fármaco é baseada na sua capacidade de atingir concentrações altas na urina e nas suas propriedades para eliminar os agentes mais frequentemente encontrados nestas infecções (Kogika, 2009). A identificação das bactérias no exame do sedimento, especialmente se este for sujeito a coloração Gram, aumenta a probabilidade de sucesso da escolha empírica do antibiótico, já que, por exemplo, as *E.coli*, que constituem o agente patogénico mais frequente na ITU, são bacillus gram-negativos associados a acidúria, enquanto os *Staphylococcus* são coccus gram-positivos associados a alcalúria (Bartges, 2007).

Os antibióticos mais frequentemente utilizados para o tratamento da ITU simples são amoxicilina com ácido clavulânico, cefalosporinas, trimetoprim-sulfadiazina e enrofloxacina, e devem ser administrados durante 10 a 14 dias (Kogika, 2009). Se esse fármaco for escolhido e administrado na dose e frequência correctas, deverá haver resolução dos sinais clínicos em 48 horas, e os resultados da urianálise devem também melhorar durante esse

período. Se possível, deve ser realizada uma urocultura de controlo 5 a 7 dias após o fim do tratamento (Bartges, 2005).

O tratamento de uma ITU complicada deve ser feito com base nos resultados da urocultura e TSA, em que o fármaco escolhido deve ter elevada excreção urinária, não deve ser nefrotóxico nem produzir efeitos secundários. Neste tipo de infecção, o mais importante é reconhecer os factores predisponentes e tentar tratá-los ou resolvê-los (Kogika, 2009).

No caso da recidiva de uma ITU ou na ITU persistente, o tratamento deve durar pelo menos 6 semanas e ser baseado na determinação da CIM. Devem ser realizadas uroculturas durante o tratamento e também após o fim deste. Se a urocultura foi negativa durante o tratamento, mas após a descontinuação deste houve outra vez isolamento do agente patogénico após apenas alguns dias, então o antimicrobiano deve ser administrado por mais 4 a 6 meses e é importante investigar uma possível causa subjacente. Se o relapso foi detectado após mais de 10 dias após o fim do tratamento, este deve ser repetido mas com um antimicrobiano diferente e por um período mais longo (Kogika, 2009). Antes de se reiniciar o tratamento deve ser realizada uma urocultura (Bartges, 2005).

Reconhecer o envolvimento renal ou prostático numa ITU é um factor importante para a formulação do plano terapêutico no caso de uma ITU recorrente (Polzin, 2007). O tratamento deve durar pelo menos 8 semanas (Kogika, 2009) e é necessário seleccionar um agente antimicrobiano que atinja altas concentrações na urina e no sangue de modo a ter capacidade para erradicar infecções mais profundas, como ocorre na prostatite e na pielonefrite (Polzin, 2007).

No caso de prostatite, o fármaco antimicrobiano utilizado deve ser uma base fraca e lipossolúvel, e que atinja uma concentração plasmática de pelo menos quatro vezes a CIM, como por exemplo, fluoroquinolonas, trimetoprim, cloranfenicol (Senior, 2006), eritromicina e clindamicina (Kogika, 2009).

No caso da pielonefrite, são as fluoroquinolonas os fármacos que mais provavelmente atingem concentrações terapêuticas no tecido renal (Polzin, 2007), mas também tendo como opção o trimetoprim-sulfamida (Kogika, 2009).

No caso de reinfeção, cada episódio deve ser tratado individualmente. A administração do fármaco antimicrobiano deve ser por um período de pelo menos 6 a 8 semanas, e devem ser realizadas uroculturas, as quais devem ser negativas durante e após o fim do tratamento (Kogika, 2009).

As uroculturas realizadas a meio do tratamento têm como objectivo reconhecer se o tratamento está a ser eficaz, de modo a evitar um período prolongado de terapêutica desnecessária. Assim, se 3 a 5 dias após o início do tratamento a urocultura é positiva, o plano terapêutico deve ser reavaliado. Se pelo contrário, não existir crescimento bacteriano nessa urocultura, o tratamento deve ser mantido (Polzin, 2007).

II.2. DOENÇA ONCOLÓGICA NO CÃO

A neoplasia afecta a maioria, se não todas, as espécies de vertebrados.

Com algumas excepções tende a ser uma doença relacionada com o aumento da idade, e é presumivelmente devido a essa razão que a neoplasia é mais frequentemente encontrada em cães e gatos, relativamente a outros animais domésticos, já que a estes é permitido viverem toda a sua esperança de vida.

É considerado que o envelhecimento *per si* não é um factor directo de indução de neoplasia, mas presumivelmente permite o aumento da oportunidade de desenvolvimento desta alteração, incluindo a exposição cumulativa a carcinogénios ambientais. Além disso, o desenvolvimento de neoplasia é um processo muito prolongado, que frequentemente requer metade do tempo de vida normal do animal para se desenvolver.

A doença neoplásica é a maior causa de morbilidade e de mortalidade nos animais domésticos, em que a frequência de ocorrência dos vários tipos de tumores varia consideravelmente entre as espécies (Slauson & Cooper, 2002).

II.2.1. TUMORES BENIGNOS *VERSUS* MALIGNOS

Massas semelhantes a neoplasias nos animais domésticos devem ser devidamente diagnosticadas para se distinguirem processos reactivos ou inflamatórios de neoplasia, de modo a que possa ser iniciado o tratamento adequado.

Se é diagnosticada a existência de uma massa neoplásica (Tabela 5), deve ser determinado se esta é benigna ou maligna, e no último caso, deve ser feito o estadiamento de malignidade, de modo a que o médico veterinário consiga prescrever o tratamento correcto e informar o dono do prognóstico (Powers, 2003).

Tabela 5 - Características gerais do tecido neoplásico (Powers, 2003)

Características gerais de tecido neoplásico
Desorganização da estrutura do tecido
Alto grau de celularidade
Aumento do rácio núcleo/citoplasma
Atipia nuclear
Nucléolo proeminente
Áreas de necrose
Aumento da actividade mitótica
Capacidade invasiva

As neoplasias são designadas de acordo com um sistema binomial, no qual são considerados dois parâmetros (Tabela 6):

- a sua origem histológica, ou seja, o tecido ou tipo celular de onde a neoplasia provém, e que geralmente pode ser dividida em epitelial ou mesenquimatosa,
- e o seu comportamento biológico, o qual inclui o grau de diferenciação das células neoplásicas e o padrão de crescimento, e é dividido em benigno ou maligno (Slauson & Cooper, 2002).

Tabela 6 - Classificação binomial dos tumores (Slauson & Cooper, 2002)

Comportamento biológico	Origem histológica	
	Epitelial	Mesenquimatoso
Benigno	Sufixo “-oma”	Sufixo “-oma”
Maligno	Sufixo “-carcinoma”	Sufixo “-sarcoma”

Em algumas neoplasias, a origem exacta das células neoplásicas é incerta ou desconhecida, como por exemplo, o histiocitoma maligno, em que é mais provável que este seja um tumor mesenquimatoso apesar do seu nome (Powers, 2003).

Têm sido utilizados vários critérios para determinar o comportamento biológico das neoplasias, e assim classificá-las como benignas ou malignas.

As neoplasias benignas, geralmente, apresentam um crescimento lento, ao contrário dos tumores malignos os quais têm crescimento rápido. Ambos os tipos de neoplasias crescem por expansão, frequentemente comprimindo os tecidos normais adjacentes, mas, no entanto, as neoplasias benignas permanecem claramente delimitadas dos tecidos envolventes não-neoplásicos e podem ser encapsuladas, enquanto as neoplasias malignas são fracamente delineadas dos tecidos circundantes, infiltrando-os frequentemente.

As neoplasias benignas geralmente são bem diferenciadas e conservam a estrutura do tecido de origem, quer citologicamente, na qual a morfologia citoplasmática e nuclear são semelhantes ao tecido precursor, quer arquitecturalmente.

Por outro lado, as neoplasias malignas diferem muito no seu grau de diferenciação, mas apresentam, geralmente, algum grau de anaplasia, isto é, perda de diferenciação, a qual é uma das características morfológicas mais importantes de malignidade. O núcleo dessas células é grande, hipercromático ou vesicular, de forma anormal e pode conter um ou mais nucléolos proeminentes.

Figuras mitóticas, incluindo formas aberrantes, são mais frequentemente observadas nas neoplasias malignas relativamente às benignas, e o número de figuras mitóticas por campo microscópico (índice mitótico) é frequentemente utilizado como critério para avaliar a proliferação das células tumorais, e assim, o seu grau de malignidade.

Uma característica muito importante das neoplasias malignas é a sua tendência para infiltrarem vasos sanguíneos e linfáticos, levando à disseminação sistêmica e consequente desenvolvimento de metástases em locais distantes da neoplasia primária. Assim, o desenvolvimento de metástases é um dos critérios de malignidade (Tabela 7) (Slauson & Cooper, 2002).

Tabela 7 - Comportamento biológico de tumores benignos *versus* malignos (Slauson & Cooper, 2002)

Critério	Benigno	Maligno
Velocidade de crescimento	Lento	Rápido
Modo de crescimento	Expansivo, encapsulado, circunscrito	Expansivo, infiltrativo, pouco definido
Diferenciação celular	Uniforme, bem diferenciado	Pleomórfico, pouco diferenciado
Figuras mitóticas	Raras	Comuns
Invasão de vasos	Rara	Frequente
Metástases	Ausente	Frequente

Existe a possibilidade de as neoplasias malignas conservarem alguma da sua capacidade funcional. No entanto, muitas vezes essas funções podem ser prejudiciais para o hospedeiro (Slauson & Cooper, 2002).

II.2.2. ESTADIAMENTO TUMORAL E ESTADIAMENTO CLÍNICO

O estadiamento tumoral consiste num processo em que, pela análise histológica, se determina o grau de malignidade (Powers, 2003), ou seja, consiste numa tentativa de quantificação de características (Slauson & Cooper, 2002).

Em Medicina Veterinária, alguns destes sistemas de estadiamento foram adaptados da Medicina Humana. Outros sistemas foram estabelecidos usando alguns dos critérios de rotina para a determinação de malignidade, como por exemplo, o grau de diferenciação, o índice mitótico, o grau de pleomorfismo celular e nuclear, percentagem de necrose, invasão, resposta linfóide ou inflamatória, entre outros (Powers, 2003). Destes parâmetros, o índice mitótico e a percentagem de necrose são os mais objectivos.

Frequentemente, ao realizar o estadiamento de uma neoplasia, cada parâmetro individual é classificado numa escala de 1 a 3, dando origem, no final, ao grau de malignidade do tumor (Powers, 2003).

Estes sistemas só apresentam utilidade se a sua capacidade de correlacionar características morfológicas com o comportamento clínico for estabelecida para cada tipo de neoplasia em cada espécie animal (Slauson & Cooper, 2002). No caso dos cães isto já se verifica para determinadas neoplasias, as quais incluem: mastocitoma, sarcoma de tecidos moles, osteossarcoma mandibular e/ou apendicular, linfoma maligno, hemangiossarcoma, carcinoma mamário, carcinoma do pulmão, carcinoma das células de transição, entre outras (Powers, 2003).

O estadiamento clínico descreve a extensão anatómica da neoplasia a um determinado tempo, e determina a exequibilidade da terapêutica. O sistema TNM de classificação dos tumores nos animais domésticos, desenvolvido em 1980 por L. Owen, é o mais utilizado e adaptado em Medicina Veterinária.

O sistema de estadiamento clínico deve basear-se no conhecimento do comportamento clínico dessa neoplasia e nos factores que são importantes para determinar o seu prognóstico.

Como já referido, as neoplasias malignas caracterizam-se por serem localmente invasivas ou apresentarem crescimento infiltrativo, e pela sua capacidade de metastisarem noutras partes do corpo, através da via linfática ou hematogénea. Deste modo, o estadiamento clínico tem em conta a neoplasia primária, os linfonodos locais e regionais e os órgãos distantes onde as metástases se podem desenvolver (Tabela 8) (Dobson, 2003).

Tabela 8 - Parâmetros considerados no sistema TNM (adaptado de Dobson, 2003)

Classificação TNM	
T: Neoplasia primária	<ul style="list-style-type: none"> • Tamanho da massa primária (ex: tumor mamário de diâmetro <3cm tem prognóstico mais favorável que tumores maiores) • Grau de mobilidade • Grau de circunscrição • Aderência aos tecidos subjacentes • Ulceração
N: Linfonodos, locais e regionais	<ul style="list-style-type: none"> • Tamanho • Forma • Textura • Mobilidade
M: Metástases	<ul style="list-style-type: none"> • Presença ou ausência

Por exemplo, pela aplicação do sistema TNM, um canídeo fêmea com carcinoma mamário com 3 a 5 cm de diâmetro, presença de metástases no linfonodo ipsilateral e sem metástases distantes, apresenta uma neoplasia T1, N1 e M0 (Dobson, 2003).

II.2.3 NEOPLASIAS MALIGNAS NOS CANÍDEOS

A neoplasia é uma importante doença nos animais de companhia, sendo umas das suas principais causas de morte ou eutanásia. No entanto, o desenvolvimento de estimativas razoavelmente precisas da morbilidade e mortalidade oncológicas nos animais domésticos, tem-se revelado difícil.

Nos humanos os registos de doença oncológica existem e são desenvolvidos desde cerca 1940 (Vascellari, Baioni, Ru, Carminato & Mutinelli, 2009). Por outro lado, nos animais de companhia a primeira tentativa de efectuar registos ocorreu em 1960, mas esses registos existem em pequenos números e são esporádicos (citado por Brønden, Nielsen, Toft & Kristensen, 2010b). Assim, existe pouca informação disponível sobre a incidência dos diferentes tipos de neoplasia nestas espécies (Vascellari *et al.*, 2009), já que a comparação de informação é difícil devido à variabilidade dos métodos de colheita de dados e dos critérios de inclusão (citado por Brønden *et al.*, 2010b).

Concluindo, existe pouca informação acerca da incidência, tipo, localização e comportamento das neoplasias nas populações caninas (citado por Brønden *et al.*, 2010b).

Têm sido observadas marcadas variações nos tipos e ocorrência de neoplasias entre Inglaterra, USA e Austrália (Bostock & Curtis, 1984), e na Noruega foram reportadas diferenças significativas entre diferentes raças caninas (citado por Brønden *et al.*, 2010b).

Num estudo recente acerca da frequência das neoplasias em canídeos, realizado na Dinamarca (Brønden *et al.*, 2010b), observou-se que a idade média de diagnóstico de neoplasia maligna foi de 9 anos, com as fêmeas a serem diagnosticadas ligeiramente mais tarde (9,4 anos) que os machos (8,5 anos). Além disso, houve um número mais elevado de neoplasias nas fêmeas do que nos machos, o que sugere a existência de predisposição para o desenvolvimento de neoplasias das primeiras. No entanto, este resultado foi uma consequência das neoplasias específicas do sexo e não pode ser extrapolado para todas as neoplasias (Brønden *et al.*, 2010b).

A predisposição para o desenvolvimento de neoplasias foi encontrada em duas raças, o Boxer e o Bouvier de Berna. Ambas apresentaram uma frequência 3 vezes superior à média da população (Brønden *et al.*, 2010b), o que está de acordo com outros estudos realizados anteriormente, nos quais foi sugerida predisposição genética e reportado elevado risco dos animais da raça Boxer, para o desenvolvimento de neoplasias (citado por Brønden *et al.*, 2010b). Relativamente ao Bouvier de Berna, a elevada frequência de neoplasia pode ser devida à presença de histiocitoma maligno na população. Pelo contrário, o Pastor Alemão e

o Labrador apresentaram resultados que significam que estas raças desenvolvem neoplasias menos frequentemente que a média da população (Brønden *et al.*, 2010b).

Relativamente às neoplasias malignas, ainda no mesmo estudo, as mais frequentemente diagnosticadas foram, por ordem decrescente, o adenocarcinoma, o mastocitoma, o linfoma, seguidas por outras (Brønden *et al.*, 2010b).

Noutro estudo recente, desta vez realizado nos USA, não foi encontrada predisposição rática ou sexual aparente em animais com múltiplas neoplasias primárias distintas (Rebhun & Thamm, 2010).

Num estudo realizado em Portugal, verificou-se que os canídeos mais afectados por neoplasias eram os de raça indeterminada, seguidos pelos animais de raça Cocker, Boxer e Caniche. Verificou-se ainda que a neoplasia mais frequente foi o carcinoma mamário (Salvado, 2010).

II.2.3.1. ALGUMAS DAS NEOPLASIAS MALIGNAS MAIS FREQUENTES NOS CANÍDEOS

II.2.3.1.1. NEOPLASIA MAMÁRIA

Os tumores da glândula mamária são a neoplasia mais comum nos canídeos (Baptista, Martins, Santos, Ribeiro & Matos, 2008), particularmente nos países europeus onde os animais não são, por rotina, esterilizados enquanto jovens (Morris, 2010). Quando as cadelas são ovariectomizadas antes do primeiro estro, o risco de desenvolverem tumores mamários é de apenas 0,5%, enquanto quando apenas são sujeitas a esse procedimento depois do primeiro estro ou depois do segundo estro, o risco de desenvolverem esta neoplasia é de 8% e 26%, respectivamente. Após o terceiro ciclo estrico, já não existe efeito protector (Chun & Garret, 2005).

Verifica-se uma elevada heterogeneidade dos tipos de tumor (Tabela 9), em que os tumores mistos são os mais comuns, e as neoplasias malignas apresentam frequências superiores às benignas (Cassali *et al.*, 2009).

Tabela 9 - Diferentes tipos histológicos de tumores mamários malignos (Rutteman & Kirpensteijn, 2003)

Tumores mamários malignos

Carcinoma *in situ* (não infiltrativo)

Carcinoma complexo

Carcinoma simples: tubular/papilar, sólido ou anaplástico

Carcinoma de células escamosas

Sarcoma: fibrossarcoma, osteossarcoma ou outros sarcomas

Carcinossarcoma

Os tumores mamários são raros antes dos dois anos de idade, mas a sua incidência aumenta lentamente a partir dos 4 anos de idade, com um pico entre os 6 e os 10 anos (Rutteman & Kirpensteijn, 2003).

Não é possível diferenciar os tumores mamários

como sendo benignos ou malignos apenas pelo exame físico. Nalguns casos, a citologia por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) da massa sólida é suficiente para fornecer um diagnóstico, se o citologista conseguir observar elementos suficientes de malignidade. Mas por vezes isto não é possível (Rutteman & Kirpensteijn, 2003) e nesse caso é necessário recorrer à histopatologia.

O tratamento destes tumores é predominantemente cirúrgico, e por isso o tecido suspeito é facilmente enviado para avaliação histopatológica, em que o patologista tem a capacidade de fornecer uma classificação tumoral precisa e, assim, uma estimativa do prognóstico (Morris, 2010). Como antes da cirurgia raramente se conhece a natureza histológica do tumor, a excisão deve ser realizada com margens com cerca de 2 a 3 cm, em que a mastectomia é a abordagem mais indicada. A análise histopatológica da peça cirúrgica pode fornecer ao clínico informações sobre o tipo de tumor, o tipo de crescimento e se a recessão cirúrgica foi completa (Rutteman & Kirpensteijn, 2003).

O tipo de crescimento está fortemente relacionado com a probabilidade de excisão completa, e estes dois factores estão ambos relacionados com o risco de recorrência local. Além disso, o tipo de crescimento é também importante no que diz respeito ao risco de desenvolvimento de metástases distantes (Rutteman & Kirpensteijn, 2003).

A radiologia tem sido considerada o meio de diagnóstico de eleição para a detecção de lesões pulmonares. Num estudo recente, observou-se que, apesar de a Tomografia Axial Computorizada (TAC) ser mais sensível que a radiografia torácica para a avaliação de metástases pulmonares, esta última é mais rápida, com menores custos e não requer anestesia geral. Nos primeiros estadios da doença, o padrão radiográfico mais comum da neoplasia mamária canina consiste na presença de um padrão alveolar nodular, com as lesões localizadas predominantemente nos lobos pulmonares acessórios e caudais (Baptista *et al.*, 2008). O seguimento dos casos de tumor mamário maligno deve ser realizado um mês após a cirurgia e posteriormente, em intervalos de 3 meses durante o primeiro ano (Rutteman & Kirpensteijn, 2003).

II.2.3.1.2. MASTOCITOMA CANINO

A pele consiste na localização anatómica mais comum para o desenvolvimento de neoplasias (Brønden *et al.*, 2010b) onde uma grande variedade destas lesões pode ser encontrada, assim como no tecido celular subcutâneo e glândulas anexas (Brønden, Eriksen & Kristensen, 2010a). No entanto, a maioria destas neoplasias são diagnosticadas como benignas, como por exemplo, lipomas e adenomas (Brønden *et al.*, 2010a).

O mastocitoma, além de ser uma das neoplasias malignas mais frequentemente encontradas nos canídeos, é também a neoplasia de maior malignidade (citado por Brønden *et al.*, 2010a) e mais frequente na pele (Brønden *et al.*, 2010a), a qual representa um desafio

diagnóstico e cirúrgico devido ao seu alto grau de variabilidade de comportamento biológico, desde benigno a altamente maligno (citado por Brønden *et al.*, 2010a).

Os mastocitomas são encontrados principalmente em animais de meia-idade, mas têm sido reportados casos em idades entre as 3 semanas e os 19 anos. Eles ocorrem em muitas raças, mas são mais frequentes nos animais de raça Boxer, Staffordshire Bull Terrier, Labrador, Golden Retriever, entre outras. E não existe predilecção de sexo (Murphy, 2003). Ocasionalmente, a manipulação destas massas resulta na desgranulação e libertação de mediadores inflamatórios, como a histamina e heparina, provenientes dos grânulos dos mastócitos. Este fenómeno origina eritema e a formação de uma pápula e é designado por sinal de Darier.

A histamina pode também causar efeitos sistémicos e assim provocar vômito e ulceração gastrointestinal através da estimulação dos receptores H2 (Murphy, 2003).

O tratamento do mastocitoma inclui cirurgia, radiação e quimioterapia, ou a combinação destes. Num estudo foi concluído que o mastocitoma de grau I requer apenas ressecção local e o mastocitoma de grau II pode ser tratado com sucesso pela ressecção profunda e com 2 cm de margem. O mastocitoma de grau III acarreta um pior prognóstico, mas o sucesso do tratamento pode ser melhorado se o animal for sujeito a radiação ou a quimioterapia após a ressecção cirúrgica (citado Brønden *et al.*, 2010a).

Estes tumores podem metastisar para o linfonodo local, fígado, baço e medula óssea, mas raramente para os pulmões (Murphy, 2003).

Os factores de prognóstico relevantes incluem o estadiamento tumoral (Tabela 10), o estadiamento clínico, a raça do hospedeiro, a localização do tumor e o tratamento (cirurgia, radiação e quimioterapia) (Dobson & Scase, 2007).

Tabela 10 – Exemplos de critérios histológicos para determinação do grau do mastocitoma (Murphy, 2003)

Grau	Crítérios
Grau 1 (bem diferenciado)	<ul style="list-style-type: none">• grupos compactos de células neoplásicas, confinados à derme• células redondas e monomórficas, sem figuras mitóticas, sem ulceração
Grau 2 (diferenciação intermédia)	<ul style="list-style-type: none">• infiltração do tecido subcutâneo• algumas células redondas, outras ovais, algumas pleomórficas, 0-2 figuras mitóticas por campo, áreas difusas de necrose ou edema
Grau 3 (fracamente diferenciado)	<ul style="list-style-type: none">• células pleomórficas, 3-6 figuras mitóticas por campo, edema, hemorragia e necrose comuns

Geralmente, a PAAF é suficiente para o diagnóstico de mastocitoma. No entanto, para o estadiamento tumoral é necessário recorrer à histopatologia (Dobson & Scase, 2007).

O sistema mais utilizado para o estadiamento clínico do mastocitoma é o da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tabela 11). Recentemente diversos estudos têm questionado a utilidade deste sistema, especialmente em relação ao estádio clínico III, no qual são incluídos os nódulos cutâneos múltiplos, sob a presunção de que estes representam metástases sistêmicas da doença. No entanto, é cada vez mais aceite que os cães podem desenvolver mais do que um mastocitoma simultaneamente ou ao longo do tempo como eventos primários separados. Além disso, múltiplos mastocitomas não indicam um pior prognóstico relativamente à existência de apenas uma massa do mesmo grau histológico (Murphy, Sparkes, Blunden, Brearley & Smith, 2006).

Tabela 11 - Critérios da OMS para o estadiamento clínico de mastocitoma (Murphy, 2003)

Estádio	Critérios
Estádio clínico 0	Uma massa, sem envolvimento da derme, sem envolvimento do linfonodo regional
Estádio clínico I	Uma massa confinada à derme sem envolvimento do linfonodo regional
Estádio clínico II	Massa confinada à derme com envolvimento do linfonodo regional
Estádio clínico III	Múltiplas massas ou grande massa infiltrativa, com ou sem envolvimento do linfonodo regional
Estádio clínico IV	Qualquer massa com metástases distantes ou recorrência com metástases

II.2.3.1.3. LINFOMA CANINO

O linfoma constitui mais de 24% de todas as neoplasias caninas e mais de 80% dos cancros hematopoiéticos caninos (Tsai *et al.*, 2009). É caracterizada pela proliferação maligna de células linfóides a partir de qualquer órgão que contenha células linfóides (Argyle, 2008).

Esta neoplasia é diagnosticada predominantemente em animais com idade média compreendida entre os 6 e os 9 anos (Tsai *et al.*, 2009) e o sexo não constitui um factor importante (Vail, 2003).

As raças que têm sido reportadas como tendo maior incidência de linfoma incluem o Boxer, Bull Mastiff, Basset Hound, São Bernardo, Scottish Terrier, Airedale e Bulldog (Tsai *et al.*, 2009). Apesar desta neoplasia poder ocorrer em qualquer raça (Vail, 2003), existem raças

com menor risco de desenvolverem linfoma, como os Spitz Alemão Anão e os Teckels (Tsai *et al.*, 2009).

O linfoma multicêntrico canino é tratável com quimioterapia com múltiplos fármacos (Tsai *et al.*, 2009). Existem vários protocolos quimioterapêuticos disponíveis para o tratamento deste tipo de linfoma, que se baseiam nos seguintes fármacos: ciclofosfamida (Cytosan[®]), vincristina (Oncovin[®]), prednisolona, doxorrubicina (hidroxidaunorrubicina ou Adriamicin[®]) e L-asparaginase (Moore, 2007). Apesar de com os protocolos COP (C=ciclofosfamida, O=vincristina, P=prednisolona) os animais atingirem remissão completa em 60-70% dos casos e tempos de sobrevivência entre os 6 e 7 meses, foi estabelecido que os protocolos que incluem a combinação de doxorrubicina (protocolos CHOP; C=ciclofosfamida, H=doxorrubicina, O=vincristina, P=prednisolona) (Argyle, 2008), combinados ou não com a L-asparaginase (Jeglum, 2009), dão melhores resultados, em que 80 a 90% dos animais atingem a remissão e têm tempos de sobrevivência que rondam os 12 meses (Argyle, 2008). Existem muitas variações do protocolo CHOP, todos com tempos de sobrevivência semelhantes, sendo essas variações baseadas em diferenças na ordem de administração dos fármacos, nas doses e duração do protocolo, e na combinação ou não de L-asparaginase. Um destes protocolos é o L-CHOP (L=L-asparaginase) da Universidade de Madison-Wisconsin (Tabela 12) (Chun, 2009).

Os animais que atingem a remissão completa, geralmente não manifestam sinais clínicos da doença e subsequentemente retornam a uma boa qualidade de vida. O tempo de sobrevivência pós-tratamento pode ser superior a 24 meses, mas frequentemente não ultrapassa os 12 meses (Tsai *et al.*, 2009).

Os linfomas podem ser classificados com base em dois parâmetros:

- localização anatômica, sendo a forma multicêntrica a mais comum (cerca de 80% dos casos), seguida da mediastínica cranial, gastrointestinal e cutânea. As formas extranodais primárias são pouco comuns nesta espécie.
- sistema de classificação histológica / imunofenotípica. Com base em vários sistemas, os tumores são categorizados como tendo baixa ou elevada malignidade, em que cerca de

Tabela 12 - Protocolo L-CHOP de Wisconsin-Madison (Adaptado de Chun, 2009)

Semana	Fármacos
1	Vincristina + Prednisona + L-asparaginase
2	Ciclofosfamida + Prednisona
3	Vincristina + Prednisona
4	Doxorrubicina + Prednisona
6	Vincristina
7	Ciclofosfamida
8	Vincristina
9	Doxorrubicina
11	Vincristina
13	Ciclofosfamida
15	Vincristina
17	Doxorrubicina
19	Vincristina
21	Ciclofosfamida
23	Vincristina
25	Doxorrubicina

80% dos linfomas caninos são classificados na última categoria. Os linfomas de baixo grau de malignidade tipicamente são de evolução mais arrastada, e, sem tratamento, estão associados a tempos de sobrevivência mais prolongados. No entanto, são menos responsivos à quimioterapia. Por outro lado, os linfomas de malignidade mais elevada são de evolução mais rápida e menor tempo de sobrevivência no caso de não serem tratados. Mas se submetidos a tratamento apresentam maior resposta a este que os linfomas de baixo grau de malignidade (Vail, 2003). A imunofenotipagem possibilita a classificação dos tumores como sendo de células T (CD3) ou células B (CD79), em que estes últimos são os mais comuns, mas os primeiros são de pior prognóstico. Apesar disso, na prática clínica, o facto de o tumor ser de células T ou B não afecta a terapêutica oferecida, mas pode, por outro lado, alterar a vontade do dono para o tratamento (Argyle, 2008).

Após ter sido realizado o diagnóstico de linfoma, deve ser determinada a extensão da doença, em que a OMS tem um sistema de estadiamento clínico da doença, utilizado frequentemente (Tabela 13). A maioria dos animais (mais de 80% dos casos) é apresentada já em estadios avançados (III-IV) (Vail, 2003).

Tabela 13 - Sistema de estadiamento clínico de linfoma da OMS nos animais domésticos (Vail, 2003)

Estadio	Descrição
I	Envolvimento de apenas 1 linfonodo, ou tecido linfoide em apenas 1 órgão
II	Envolvimento de vários linfonodos numa região
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos
IV	Envolvimento do fígado e/ou baço (+/- estadio III)
V	Manifestação sanguínea e envolvimento da medula óssea e/ou outro sistema
Sub-estadio	
a	Sem sinais sistémicos
b	Com sinais sistémicos

II.2.4. SÍNDROME PARANEOPLÁSICA

As síndromes paraneoplásicas resultam dos efeitos indirectos dos tumores que, devido à produção e libertação de substâncias biologicamente activas, tais como, hormonas, factores de crescimento e citoquinas (Gaschen & Teske, 2005), podem ter efeitos metabólicos, endócrinos ou hematológicos em locais distantes da neoplasia primária, sendo então estes

efeitos conhecidos como síndromes paraneoplásicas (Gould, 2003). Assim, o sistema imunitário pode ser afectado, levando a alterações imunitárias como autoimunidade, produção de complexos imunes ou imunossupressão (Gaschen & Teske, 2005).

A neoplasia maligna também pode estar associada à síndrome anorexia-caquexia, a síndrome paraneoplásica mais comum nos animais. Neste caso, os animais apresentam sinais de anorexia, perda de peso, fadiga e também diminuição da função imunitária sendo esta última causada pela excessiva degradação proteica (Gould, 2003).

II.2.4.1. IMUNOSSUPRESSÃO

É comumente observado que animais portadores de tumores estão muitas vezes imunodeprimidos (Tizard, 2004). O facto é que, apesar de o tumor frequentemente provocar uma resposta imunitária vigorosa durante a fase inicial do seu crescimento, esta resposta é rapidamente suprimida, permitindo o progressivo crescimento tumoral (Yang & Carbone, 2004).

Os tumores provocam alterações locais que lhes permitem evadirem-se à destruição imunitária, mas também produzem factores imunossupressores que exercem efeitos sistémicos na função das células imunitárias (Yang & Carbone, 2004).

Esta imunossupressão é mais visível em animais com tumores linfóides. Assim, tumores de células B tendem a suprimir a formação de anticorpos, enquanto os tumores de células T, geralmente, suprimem as respostas mediadas por células e a actividade das células *natural killer* (Tizard, 2004). No entanto, em Medicina Humana, estes efeitos imunossupressores estão descritos, em vários estudos, em vários tipos de tumores, incluindo tumores sólidos.

A evasão tumoral às defesas imunitárias reflecte uma miríade de influências na imunocompetência, e diversos defeitos têm sido implicados, os quais incluem, processamento antigénico alterado pelas células tumorais, anergia de células T citotóxicas específicas, recrutamento de tipos celulares inibidores e recrutamento de células T reguladoras (citado por Pinzon-Charry, Maxwell & López, 2005).

Os mecanismos moleculares através dos quais as células cancerígenas escapam à resposta imunitária do hospedeiro têm sido investigados *in vitro* e em modelos *in vivo*. Vários mecanismos têm sido envolvidos, tais como células T imunossupressoras, citocinas imunossupressoras, falta de co-estimulação, entre outros (Rabinovich, Gabrilovich & Sotomayor, 2007).

O microambiente do tumor é rico em citocinas imunossupressoras, como o factor de crescimento vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor, VEGF), o factor transformador de crescimento- β (*Transforming growth factor- β* , TGF- β), a Interleucina (IL)-10 e IL-13, sendo que algumas destas citocinas são produzidas directamente pelo tumor, enquanto outras são produzidas por células imunitárias chamadas para o local do tumor.

Estas citoquinas podem ter um grande impacto no tipo de resposta das células T elicitada pelas CDs (Taylor, Verhagen, Blaser, Akdis & Akdis, 2006).

Tem sido demonstrado que as CDs, ou seja, as células apresentadoras de antígeno chave para a iniciação de respostas imunitárias (Pinzon-Charry *et al.*, 2005) com importantes funções na imunidade mediada por células T e na tolerância dessas mesmas células (Cools *et al.*, 2008), não são recrutadas ou activadas em cancros humanos e que a sua função pode estar comprometida pelo tumor (Pinzon-Charry *et al.*, 2005).

Já foi reportado em alguns estudos que o número de CDs sanguíneas está diminuído em pacientes com diversos tipos de tumor e doença metastática. Esta diminuição da frequência associada ao fenótipo imaturo das CDs, também já foi reportada no sangue periférico (citado por Pinzon-Charry *et al.*, 2005).

Já é claro que as alterações nas CDs, devido à doença oncológica, têm repercussões a nível sistémico, e não são apenas localizadas aos tecidos tumorais (Bennaceur, Chapman, Touraine & Portoukalian, 2009), o que é suportado pela noção de que factores solúveis derivados das células tumorais afectam as CDs (Rabinovich *et al.*, 2007). Assim, a diferenciação anormal das CDs é o resultado do efeito combinado de diversos factores (Kusmartsev & Gabrilovich, 2006), entre os quais se encontram:

- IL-10 (Bennaceur *et al.*, 2009)

É uma citoquina imunossupressora, que induz efeito anti-inflamatório e regula a função das células T, *natural killer* e macrófagos (Tizard, 2004). Esta citoquina pode ser produzida por células Th1, Th2, T reguladoras (Treg), T CD8⁺, CDs, monócitos, células B, entre outras (Tizard, 2004). A IL-10 é produzida particularmente por células Tr1, um dos sub-tipos de células Treg (citado por Taylor *et al.*, 2006).

Esta foi a primeira citoquina a ser reconhecida como tendo um papel inibidor na função das CDs na doença oncológica (Bennaceur *et al.*, 2009). A IL-10 inibe a capacidade das CDs para estimularem as células T, favorece a indução de anergia antígeno-específica e suprime as respostas dos linfócitos T citotóxicos e a produção de IL-12 (citado por Bennaceur *et al.*, 2009), sendo esta última produzida por monócitos e macrófagos, CDs, células B e queratinócitos (Tizard, 2004). Esta interleucina (IL-12) promove a actividade das células Th1 pela indução da secreção de IL-2 e IFN- γ , e aumenta também a proliferação e a citotoxicidade das células T e *natural killer* (Tizard, 2004).

A IL-10 tem também a capacidade de evitar a diferenciação dos monócitos em CDs, causa redução da expressão de moléculas co-estimulatórias e induz funções toleragénicas nestas células. Tem também a capacidade de alterar a importante função apresentadora de antígenos destas células (citado por Pinzon-Charry *et al.*, 2005), e suprime a proliferação das células T em células Th1 e Th2 (citado por Taylor *et al.*, 2006). Em adição, como alvo desta interleucina estão também células Th1, células B, macrófagos, células *natural killer*, mastócitos (Tizard, 2004) e monócitos (Malefyt, Abrams, Bennett, Figdor & Vries, 1991).

Através da inibição da estimulação de células T, há inibição da síntese de citocinas Th1, ou seja, IL-2, IFN- γ e Factor de Necrose Tumoral- β (*Tumor necrosis factor- β* , TNF- β), sendo que esta última destrói células tumorais e activa neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e células B. A IL-10 suprime a secreção de IL-1, IL-6 e também TNF- α pelos macrófagos, em que a IL-1 tem, além de outras funções, um importante papel na inflamação. A IL-1, além de ser produzida por macrófagos é também secretada por células T, CDs, neutrófilos, entre outras (Tizard, 2004).

A IL-10 suprime também a expressão do MHC classe II em várias células, incluindo CDs e macrófagos (Tizard, 2004).

Em adição, a IL-10 reduz a libertação de citocinas pró-inflamatórias a partir de mastócitos, diminui a função e actividade dos eosinófilos, suprime a produção de IL-5 pelas células Th0 e Th2 humanas (citado por Taylor *et al.*, 2006).

- TGF- β (Bennaceur *et al.*, 2009)

É uma importante citocina pleiotrópica com potentes propriedades imunorreguladoras (Letterio & Roberts, 1998), sendo imunossupressora (Tizard, 2004) e é essencial para a tolerância imunológica das células T CD4⁺ (Letterio & Roberts, 1998).

Este factor, nos indivíduos saudáveis, é produzido por plaquetas, macrófagos activados, células B e células T e tem acção sobre vários tipos de células, incluindo CDs, células T e B, macrófagos e neutrófilos (Tizard, 2004).

Esta citocina inibe a maturação das células dendríticas induzida pelo TNF- α e previne a migração destas células para os linfonodos (Bennaceur *et al.*, 2009). Além disso, inibe também a produção de IL-12, o que resulta na diminuição da proliferação das células T e diminuição da produção de IFN- γ , com aumento da morte celular por apoptose (Bright & Sriram, 1998).

Por sua vez, as células T apoptóticas libertam TGF- β contribuindo para o ambiente supressor (Tizard, 2004). Este factor também inibe a proliferação de células B e induz apoptose nestas.

Além disso, o TGF- β influencia a diferenciação das células Th: tende a promover resposta Th1 e a produção de IL-2 por células T ingénuas, mas também antagoniza os efeitos do IFN- γ e da IL-12 nas células de memória (Tizard, 2004).

Por último, o TGF- β bloqueia a diferenciação dos monócitos e os efeitos citotóxicos dos macrófagos (Tizard, 2004).

De acordo com um estudo recente (Szkaradkiewicz *et al.*, 2010) foi demonstrado que há elevação significativa de TGF- β no plasma da maioria dos pacientes humanos com carcinoma gástrico, em qualquer estadio da doença, e que esta elevação tem origem na neoplasia. No mesmo estudo, também foi confirmada a elevação dos níveis de IL-10 e que a sua principal origem, na doença oncológica, envolve o próprio tumor. No entanto, apesar dos resultados desse estudo demonstrarem que a diminuição da citotoxicidade das células

natural killer é uma sequela da transformação neoplásica e crescimento tumoral, a diminuição da citotoxicidade das células *natural killer* não é devida à sobre-produção de TGF- β .

- IL-6 e M-CSF (Bennaceur *et al.*, 2009)

A IL-6 e o M-CSF inibem a diferenciação das CDs a partir de precursores mieloides CD34⁺ (Ratta *et al.*, 2002)

- VEGF (Bennaceur *et al.*, 2009)

O VEGF foi o primeiro factor derivado do tumor que demonstrou inibir a diferenciação das CDs. A maioria dos estudos indica que este factor induz a proliferação das células endoteliais e a formação de neovascularização tumoral (Bennaceur *et al.*, 2009).

O VEGF afecta significativamente a diferenciação de várias linhagens hematopoiéticas *in vivo*, incluindo as CDs. Este efeito inibidor do VEGF sobre a diferenciação das CDs tem sido confirmado em estudos humanos, onde níveis elevados de VEGF estão correlacionados com um número reduzido de CDs nos tecidos tumorais e na circulação periférica em pacientes com diversos tipos de cancro (citado por Bennaceur *et al.*, 2009), e com um aumento do número de células apresentadoras de antígenos imaturas e com um fenótipo supressor na circulação de pacientes com cancro (Almand *et al.*, 2000).

- Prostanoides (Bennaceur *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos indica que os prostanoides estão implicados na carcinogénese através dos seus efeitos pró-angiogénicos. Contudo, também há indicação de que os prostanoides podem contribuir para a tumorigénese pela inibição da diferenciação das CDs (Sharma *et al.*, 2003).

A prostaglandina E2 (PGE₂), actua como promotor tumoral quando sobreproduzido (Liu *et al.*, 2001), e exibe potentes efeitos imunossupressores (Stolina *et al.*, 2000). A PGE₂ actua através dos seus receptores, EP1, EP2, EP3 e EP4, em que a expressão diferencial destes receptores medeia os diversos, e por vezes antagonistas, efeitos da PGE₂ (citado por Yang *et al.*, 2003). Num estudo efectuado em ratos com doença oncológica (Yang *et al.*, 2003) foi demonstrado que os receptores EP2 têm um importante papel na inibição induzida pela PGE₂ na diferenciação e função das CDs, e actuam como mediadores da imunodeficiência associado ao cancro. Já foi mostrado que a PGE₂ provoca aumento da produção de IL-10 e decréscimo da expressão de MHC classe II pelas CDs (Harizi, Juzan, Pitard, Moreau & Gualde, 2002). No estudo mencionado acima, através da presença do marcador CD11c, um marcador bem definido da diferenciação das CDs, observou-se que houve uma diminuição dose-dependente do número de células a expressar esse marcador, concluindo-se assim que a PGE₂ suprime a diferenciação das CDs pelo receptor EP2 (Yang *et al.*, 2003). Ainda no mesmo estudo também foi demonstrado que a PGE₂, além de suprimir a diferenciação, inibe também a função das CDs através do mesmo receptor, em que a proliferação das células T estimulada pelas CDs estava diminuída, enquanto em ratos EP2^{-/-} essa

proliferação estava normal. Assim, conclui-se que a PGE₂, através do seu receptor EP2, é crítica na indução da supressão da activação das células T mediada pelas CDs (Yang *et al.*, 2003).

Também já foi reportado que a PGE₂ também inibe a produção de IFN- γ , podendo assim interferir com a imunidade mediada por células (Cheng & Lopez, 1998).

Num estudo realizado em ratos com cancro, em 1984, foram implicados macrófagos como contribuintes para a imunossupressão. Verificou-se que os macrófagos peritoneais dos animais com tumor produziam quantidades significativamente mais elevadas de PGE, do que os macrófagos controlo. Assim, os macrófagos activados pelo tumor, ou seja, aqueles que infiltram o tumor numa reacção imunitária do hospedeiro contra o tumor, servem para amplificar o nível de imunossupressão no hospedeiro, pela produção elevada de PGE, a qual tem um papel na activação e função dos linfócitos T supressores. A estimulação da síntese de PGE pelos macrófagos é iniciada pela PGE produzida em elevada quantidade pelas células tumorais (Plescia *et al.*, 1984).

- GM-CSF

A secreção descontrolada deste factor por algumas neoplasias malignas pode ser deletéria para a resposta imunitária do hospedeiro. Em ratos, mostrou-se que a produção crónica de GM-CSF por neoplasias suprime a resposta específica dos linfócitos T citotóxicos contra a neoplasia através da formação de uma população imatura e inibidora de células apresentadoras de antígeno (Bronte *et al.*, 1999).

Foi demonstrado que, enquanto a administração de GM-CFS causa a acumulação de células imaturas e imunossupressoras, a administração de GM-CFS em combinação com a IL-4 induz a sua diferenciação em células apresentadoras de antígeno maduras (Bronte *et al.*, 1999).

- Gangliósidos

Gangliósidos são glicosfingolípidos que contêm ácido siálico, que estão implicados na regulação da proliferação e diferenciação celular (citado por Bennaceur *et al.*, 2009). Há evidência de que os gangliósidos podem contribuir para a imunossupressão induzida pelo tumor através da alteração de várias linhagens celulares (Sietsma, Nijhif, Vellenga, Kamps & Kok, 1998).

Vários tumores, incluindo linfoma, melanoma e hepatoma são conhecidos por apresentarem uma composição em gangliósidos alterada (Birklé, Zeng, Gao, Yu, & Aubry, 2003).

Além de serem expressos à superfície da membrana das células tumorais, os gangliósidos são também libertados para o micro ambiente do tumor em quantidades suficientes para circularem no sangue periférico (Portoukalian, Zwingelstein & Doré, 1979).

A lista de factores derivados dos tumores que modulam a diferenciação das CDs não está completa e está constantemente a crescer (Bennaceur *et al.*, 2009).

O efeito toleragénico das CDs imaturas é mediado por TGF- β e IL-10 solúveis secretados por células T CD4⁺ (Cools *et al.*, 2008). Num estudo recente, concluiu-se que as CDs têm um papel activo na indução da secreção de citocinas imunossupressoras pelas células T reguladoras (Treg), e que desse modo, essas células Treg condicionadas pelas CDs imaturas são globalmente imunossupressoras (Cools *et al.*, 2008).

Esta alteração da diferenciação das CDs tem várias consequências como por exemplo a diminuição da produção de CDs maduras e funcionalmente competentes e a acumulação de CDs imaturas que não têm capacidade de aumentar a expressão do MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias ou de produzir as citocinas apropriadas (Kusmartsev & Gabrilovich, 2006). Num estudo não publicado realizado por Pinzon-Charry *et al.* (2005), foi revelado que essas CDs imaturas mostram características de imaturidade, como organelas fracamente desenvolvidas e núcleo de cromatina condensada.

A apresentação de antígenos por CDs imaturas resulta na indução de tolerância, a qual pode ser causada pela geração de células Treg que suprimem as respostas imunitárias através da produção de IL-10 e TGF- β (Dhodapkar, Steinman, Krasovsky, Munz, & Bhardwaj, 2001).

Num estudo realizado em humanos, foi descrita uma subpopulação de CD que expressam indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), a qual inibe a proliferação de células T e induz a morte celular destas. Grandes quantidades destas CDs podem ser encontradas em linfonodos drenantes do tumor, sugerindo que estas células podem estar envolvidas na ausência de resposta imunitária encontrada nos pacientes com cancro (citado por Pinzon-Charry *et al.*, 2005). Esta expressão de IDO pelas CDs pode ser um dos efeitos de células T reg CD4⁺ (citado por Wang, 2006).

Apesar da importância das células T na imunovigilância e controlo do crescimento tumoral nos primeiros estadios da doença oncológica, estas células tornam-se supressoras, células T CD4⁺ e CD8⁺ reguladoras, após estimulação e interacção crónicas com as células tumorais (Wang & Wang, 2007).

Existem várias subpopulações de células Treg, que diferem no fenótipo, secreção de citocinas e mecanismo supressor. A população mais numerosa e melhor estudada é a de *natural* Tregs, as quais são produzidas em níveis relativamente constantes pelo timo, e induzem o seu efeito imunossupressor por contacto célula-a-célula (Wang & Wang, 2007).

Existem outras duas populações de células Treg induzidas por antígeno. Uma delas é constituída por células que exercem o seu efeito inibidor sobre as células T por contacto célula-a-célula e pela secreção de mediadores solúveis (Nakamura, Kitani & Strober, 2001). Estas são a subpopulação primária de células Treg que se encontra aumentada no sangue, linfonodos e tecidos tumorais em pacientes com cancro (Beyer & Schultze, 2006). As células T reguladoras 1 (Tr1), outra subpopulação de células Treg induzidas por antígeno, aparecem na periferia após encontro com o antígeno num ambiente toleragénico, e

produzem grandes quantidades de IL-10 e provocam imunossupressão via IL-10 (Gregori, Bacchetta, Passerini, Levings & Roncarolo, 2007).

Num modelo animal, o crescimento tumoral rápido com invasão local e disseminação metastática após crescimento inicial lento, coincidiu com o desenvolvimento de células T CD4⁺ supressoras (citado por Kosmaczewska, Ciszak, Potoczek & Frydecka, 2008). Recentemente, também têm sido identificadas células T CD8⁺ como outra população com propriedades supressoras (Wang, 2008).

Assim, as células Treg podem ser CD4⁺ (Tizard, 2004) ou CD8⁺ (Wang, 2008), expressam os marcadores CD25 e secretam IL-10 e/ou TGF- β para suprimir as respostas de outras células T (Tizard, 2004), sendo a sua função primária a supressão de células T CD4⁺ e CD8⁺ e de células apresentadoras de antígenos (citado por O'Neill, Guth, Biller, Elmslie & Dow, 2009).

Muitas das actividades reguladoras das células T reflectem as funções antagonistas das células Th1 e Th2. Por exemplo, o IFN- γ das células Th1 pode suprimir a produção de IgE, enquanto a produção de IL-10 pelas Th2 é supressora da produção de IL-12 pelas CDs, e por conseguinte, da produção de citocinas pelas células Th1 (Tizard, 2004).

Têm sido estudados vários marcadores associados a estas células, porém, alguns deles são também marcadores de activação e não são específicos das Treg (Wang, 2008). Por exemplo, a expressão de CD25 nas células T tem sido um marcador útil das células Treg, mas, no entanto, a sua expressão não está necessariamente associada à função das Treg, já que o mesmo marcador também é expresso por linfócitos efectores activados e não-reguladores (Wang, 2006).

O Foxp3 é o melhor marcador identificado para células Treg CD4⁺, sendo crítico para o desenvolvimento destas células (Fontenot, Gavin & Rudensky, 2003), o qual aparece em alguns tipos de cancro tanto no homem como nos ratos (Walker *et al.*, 2003), mas a sua expressão é detectada também em células T efectoras, apesar de a um nível relativamente baixo (Wang, 2008). Num estudo realizado em cães (Biller, Elmslie, Burnett, Avery & Dow, 2007) foi confirmada também a presença deste marcador nas células Treg desta espécie. No entanto, apesar de a expressão de Foxp3 ser mais elevada em células T CD4⁺, houve também alguma expressão deste factor em linfócitos não-CD4⁺ (Biller *et al.*, 2007).

Células Treg humanas movem-se e acumulam, preferencialmente, no local do tumor e foi demonstrado que linfócitos infiltrantes dos tumores são ricos em FoxP3⁺ (Albers *et al.*, 2005).

Nos linfonodos associados ao tumor, assim como nos não associados, as frequências de células Treg são inferiores às encontradas no próprio tumor, mas superiores quando se compara com as células de indivíduos saudáveis (Kosmaczewska *et al.*, 2008). Estas células existem em proporção marcadamente superior em pacientes com diversos tipos de doença oncológica, relativamente a indivíduos saudáveis (Kosmaczewska *et al.*, 2008). O

mesmo se verificou num estudo realizado em canídeos (Biller *et al.*, 2007), no qual ao serem comparadas as frequências de células Treg no sangue periférico de animais com doença oncológica e animais saudáveis, estas foram significativamente mais elevadas nos primeiros. Por outro lado, também nesta espécie parece que as células Treg se acumulam preferencialmente nos linfonodos que drenam o tumor, e que a causa do aumento destas células nos animais com neoplasia pode ser as células Treg acumuladas nesses linfonodos. Adicionalmente, parece que certos tipos de tumores, especialmente os mais malignos, estão associados a um número mais elevado de células Treg (Biller *et al.*, 2007).

As células Treg nos tumores apresentam marcada expressão de CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) e TGF- β ligado à membrana, e inibem directamente a proliferação de células T na circulação periférica (Wolf *et al.*, 2003) através da inibição da cadeia- α do receptor da IL-2 nessas células (Annunziato *et al.*, 2002). O aumento da expressão à superfície da membrana de CTLA-4 nas células Treg, pode ser uma das causas de aumento da produção de TGF- β pelas células residentes no tumor (Wolf *et al.*, 2003), e a ligação desta citocina à superfície da célula e a sua apresentação aos receptores nas células-alvo pode ser o mais importante mecanismo de imunossupressão mediada pelas células T (Chen & Wahl, 2003).

Num estudo recente (O'Neill *et al.*, 2009) realizado em canídeos, verificou-se que o número de células T CD8⁺ e células B em cães com doença oncológica estava significativamente diminuído em comparação com canídeos saudáveis, assim, como também se verificou o mesmo para as células T CD4⁺, em cães com carcinoma. Os mesmos resultados já tinham sido observados num estudo anterior (Walter, Biller, Lana, Bachand & Dow, 2006). Além disso ainda se observou que o rácio células Treg/células T CD8⁺ estava significativamente aumentado nos cães com doença oncológica, especialmente nos animais com linfoma, o que pode explicar a relativa imunodeficiência que tipicamente acompanha a doença oncológica (O'Neill *et al.*, 2009). Resultados obtidos noutro estudo sugerem que a população circulante de células T CD8⁺ efectoras no paciente com doença oncológica está diminuída e parece ser regulada pela população de células Treg CD4⁺ (Chikamatsu, Sakakura, Whiteside & Furuya, 2007).

Também já foram reportadas alterações em macrófagos que, além do aumento da produção de PGE como referido anteriormente, produzem também quantidades elevadas de IL-10 e TGF- β . Por outro lado, são hiporresponsivos e apresentam produção diminuída de GM-CSF (Walker, Burger & Elgert, 1994).

II.2.5. QUIMIOTERAPIA EM CANÍDEOS: ALGUNS DOS FÁRMACOS MAIS UTILIZADOS E SEUS EFEITOS NO HOSPEDEIRO

A quimioterapia é a principal modalidade usada no tratamento de doenças neoplásicas sistêmicas, como por exemplo neoplasias malignas hematológicas e tumores sólidos metastáticos (Frimberger, 2005).

Na Medicina Humana, o objectivo da quimioterapia é a cura, enquanto na Medicina Veterinária, o tratamento paliativo constitui um objectivo mais apropriado. A cura consiste na erradicação de todas as células tumorais e constitui o cenário ideal. No entanto, a restrição nas doses dos agentes quimioterápicos de modo a manter os efeitos secundários em níveis aceitáveis, significa que a cura é apenas possível num pequeno número de pacientes. O tratamento paliativo tem o objectivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, e assim possivelmente aumentar o seu tempo de vida, pois a eutanásia é adiada.

É importante determinar o objectivo do tratamento, pois isso frequentemente determina o curso deste. Se o tratamento é iniciado com a intenção de ser atingida a cura, há uma maior probabilidade de desenvolvimento de efeitos secundários. Por outro lado, como no tratamento paliativo o objectivo é a melhoria da qualidade de vida, é menos provável que as doses utilizadas e os esquemas adoptados resultem em efeitos secundários. No entanto, é comum o tratamento ser iniciado com o objectivo curativo e mais tarde ser alterado para paliativo (Frimberger, 2005).

No geral, os fármacos citotóxicos utilizados na quimioterapia são mais activos contra células que se dividem activamente. Assim, além de afectarem as células tumorais, estes fármacos podem ter efeitos adversos sobre tecidos saudáveis do hospedeiro que também se renovam, como são por exemplo as mucosas (tracto gastrointestinal) e as células hematopoiéticas (medula óssea) (Frimberger, 2005).

A mielossupressão é o factor de toxicidade que mais limita as doses que podem ser administradas (Frimberger, 2005). Assim, a toxicidade dos agentes quimioterapêuticos frequentemente limita as doses e frequência de administração, e os pacientes com efeitos adversos severos, muitas vezes interrompem o tratamento prematuramente, têm atrasos neste ou recebem doses reduzidas (Bacon, Ehrhart, Dernell, Lafferty & Withrow, 2008).

Num estudo realizado em canídeos, verificou-se que, sob a influência de um protocolo CHOP (C=ciclofosfamida, H=doxorrubicina, O=vincristina, P=prednisona), houve diminuição significativa do número de células B. No entanto, a administração de apenas doxorrubicina ou de um protocolo CHOP não mostrou efeitos imunossupressores significativos em termos de número de células T CD4⁺ e CD8⁺ em animais sujeitos a quimioterapia, relativamente aos valores prévios à administração dos fármacos (Walter *et al.*, 2006).

II.2.5.1. PREDNISONA

Os corticoides são úteis no tratamento de vários processos neoplásicos, e os seus benefícios podem ser atribuídos aos efeitos tumoricidas, às propriedades anti-inflamatórias e/ou imunossupressoras, e às propriedades metabólicas (Cohn, 2005).

A prednisona é frequentemente utilizada nos protocolos de quimioterapia, sozinha ou em combinação com outros fármacos, para o tratamento de linfoma e mastocitoma, por exemplo (Cohn, 2005).

Quando utilizada como único agente pode potencialmente causar poliúria, polifagia (Chun, 2009) e polidipsia (Cohn, 2005). Além disso, pode induzir um fenótipo resistente à quimioterapia (Chun, 2009).

A acção dos glucocorticoides resulta da alteração da transcrição génica celular: estes entram passivamente nas células, ligam-se a receptores intracitoplasmáticos que por sua vez migram para o núcleo celular onde exercem a sua acção (Cohn, 2005).

Os glucocorticoides exercem efeito quer negativo quer positivo nos vários ramos e componentes da resposta imunitária. Estes fármacos modelam genes envolvidos na iniciação da resposta imunitária inata (Franchimont, 2006), diminuindo a função do sistema mononuclear fagocitário e a produção de citocinas (Cohn, 2005), enquanto os seus efeitos na resposta imunitária adquirida são de supressão da imunidade celular e promoção da imunidade humoral (Franchimont, 2006).

Assim, os glucocorticoides inibem a produção de IL-12, IFN- γ , IFN- α e TNF- α pelas células apresentadoras de antígeno e pelas células Th1, mas por outro lado aumentam a produção de IL-4, IL-10 e IL-13 pelas células Th2. Através deste mecanismo, níveis elevados de glucocorticóides podem, sistemicamente, causar supressão selectiva da imunidade celular Th1, em vez de imunossupressão generalizada (Elenkov, 2006).

Além disso, estes fármacos têm capacidade de induzir tolerância a antígenos específicos, por influência na maturação e função de CD e pela promoção do desenvolvimento de células Treg produtoras de IL-10 (Franchimont, 2006).

Num estudo realizado em cães tratados com prednisona, verificou-se que os níveis plasmáticos de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) estavam significativamente diminuídos, apesar de permanecerem nos intervalos de referência (Rinkardt, Kruth & Kaushik, 1999). Os glucocorticoides deprimem a produção de IL-2 e assim, a função das células T, incluindo as Th, necessárias na estimulação das células B na produção de anticorpos (Paliogianni, Ahuja, Balow, Balow & Boumpas, 1993). Além disso, no mesmo estudo também se verificou diminuição do número de linfócitos, tanto de células T como de células B (Rinkardt *et al.*, 1999).

II.2.5.2. DOXORRUBICINA

A doxorubicina, um antibiótico antitumoral do grupo antraciclina, é um agente quimioterapêutico muito eficaz e utilizado tanto nos animais como nos humanos (Kitchell, 2005).

Os fármacos deste grupo formam complexos estáveis, ligando-se e intercalando-se com o DNA, bloqueando a síntese de DNA, ácido ribonucleico (RNA) (Lana, 2003) ou ambos (Chu & Sartorelli, 2004). Ou seja, a doxorubicina inibe a topoisomerase II, uma enzima nuclear envolvida na segregação de porções do DNA necessárias às funções celulares. Quando essa enzima é inibida, esses fragmentos de DNA não são transcritos, levando posteriormente a morte celular (citado por Reiman, Mauldin & Mauldin, 2008). A presença destas moléculas na estrutura do DNA impede assim a replicação deste e provoca alterações na produção de proteínas através de interferência na transcrição do RNA mensageiro (Kitchell, 2005).

A doxorubicina, adicionalmente, causa citotoxicidade pela formação de radicais livres os quais vão oxidar proteínas e membranas das células neoplásicas (citado por Reiman, Mauldin & Mauldin, 2008), tendo sido este mecanismo reconhecido como a causa da cardiotoxicidade deste fármaco (Chu & Sartorelli, 2004).

Os fármacos deste grupo são não-específicos do ciclo celular (Lana, 2003).

A doxorubicina é muito utilizada no tratamento do linfoma canino e felino, e é também eficaz no tratamento de tumores sólidos, particularmente no osteossarcoma, e em combinação com a ciclofosfamida (Moore, 2005), e no tratamento de hemangiossarcoma (Lana, 2003).

A eliminação desta molécula ocorre primariamente pela bÍlis, e em menor quantidade pela urina (citado por Reiman *et al.*, 2008).

A doxorubicina pode causar efeitos adversos gastrointestinais e da medula óssea, como mielossupressão (Bacon *et al.*, 2008) em que o nadir ocorre por volta dos 5 a 10 dias após a administração (Blackwood, 2008), vômito, diarreia e anorexia.

Este fármaco pode causar também cardiotoxicidade que resulta em cardiomiopatia dilatada, já que é tóxica para o miocárdio (Bacon *et al.*, 2008).

A extravasão de doxorubicina para os tecidos perivasculares pode resultar em lesões severas, e a extensão completa da lesão pode só ser aparente ao fim de 3 ou 4 semanas. Por vezes, pode ser necessária recessão cirúrgica ou desbridamento (Frimberger, 2005).

II.2.5.3. CICLOFOSFAMIDA

A ciclofosfamida pertence ao grupo de fármacos quimioterapêuticos conhecidos como agentes alquilantes, os quais produzem ligações intra e inter cadeias de DNA após a adição de um grupo alquilo (Lana, 2003), que levam à sua inativação (Hohenhaus, 2005). São estas ligações as responsáveis pelos efeitos citotóxicos da ciclofosfamida (Hohenhaus,

2005). Além disso, são activos durante a maioria das fases do ciclo celular (Kitchell, 2005), ou seja, não são específicos de nenhuma fase do ciclo celular (Lana, 2003).

Esta molécula é metabolizada no fígado para se tornar activa, e a sua excreção é maioritariamente por via renal (Lana, 2003).

Este agente pode causar citotoxicidade sistémica, a qual está geralmente relacionada com a dose e ocorre particularmente em tecidos de crescimento rápido (Chu & Sartorelli, 2004).

A ciclofosfamida é um potente imunossupressor, que afecta tanto os linfócitos T como os B (Hohenhaus, 2005).

Além da mielossupressão (neutropénia e trombocitopénia) (Lana, 2003), em que o nadir de neutrófilos é atingido cerca dos 5 a 7 dias após a administração do fármaco, a ciclofosfamida também pode causar toxicidade gastrointestinal, como vómitos e diarreia, 1 a 3 dias após o tratamento, e cistite hemorrágica. Esta última é pouco comum após a administração de ciclofosfamida (Frimberger, 2005), mas se for detectada hematúria ou se o animal desenvolver alguns sinais de cistite, a administração de ciclofosfamida deve ser suspensa (Blackwood, 2008).

Os agentes alquilantes também possuem efeitos vesicantes, podendo desse modo causar lesões tissulares no local de injeção (Chu & Sartorelli, 2004).

II.2.5.4. VINCRISTINA E VIMBLASTINA

Outro grupo de fármacos utilizado na quimioterapia é o dos inibidores mitóticos, ao qual pertencem a vincristina e a vimblastina. Estes fármacos actuam pela ligação a microtúbulos envolvidos na divisão celular (Lana, 2003), os quais também fazem parte do citosqueleto celular (Chu & Sartorelli, 2004). Através dessas ligações eles alteram o processo de mitose e inibem a divisão celular (Lana, 2003). A vincristina e a vimblastina são assim fármacos específicos do ciclo celular (Lana, 2003).

Estes fármacos são excretados por via hepática para as fezes numa forma inactiva, por isso, alterações hepáticas severas podem resultar em diminuição do seu metabolismo e aumento da toxicidade (Lana, 2003).

Além disso, são vesicantes (Lana, 2003), por isso a sua extravasão para os tecidos perivasculares também pode causar lesões, mas que neste caso raramente são severas (Frimberger, 2005).

A vincristina é curativa para o tumor venéreo transmissível canino, e é também bastante eficaz, quando utilizado em combinação com outros fármacos, nos protocolos para tratamento de linfoma canino e felino, estando também incluída nalgumas combinações para o tratamento de sarcomas (Moore, 2005).

A vincristina também tem efeitos mielossupressores, mas mais moderados que por exemplo a doxorrubicina (Frimberger, 2005) ou a vimblastina (Chu & Sartorelli, 2004). No entanto,

cães que recebem a dose mais alta ($0,75\text{mg/m}^2$) podem tornar-se neutropénicos 4 a 7 dias após a sua administração (Blackwood, 2008).

Pode também causar sinais gastrointestinais, sendo estes, geralmente, pouco frequentes, em que os animais demonstram falta de apetite no dia da administração (Blackwood, 2008). Este fármaco também já foi reportado como causador de ileus e constipação (Lana, 2003).

A vimblastina é utilizada em protocolos para tratamento de mastocitoma, e é também incluída em alguns para tratamento de linfoma (Lana, 2003). No entanto é pouco utilizada devido ao seu efeito mielossupressor, que a torna mais problemática que a vincristina na combinação com outros fármacos (Moore, 2005), com um nadir por volta dos 4 a 9 dias após a administração (Lana, 2003).

II.2.5.4. CARBOPLATINA E CISPLATINA

A Carboplatina e a Cisplatina são metais pesados que actuam através da ligação ao DNA, causando ligações intra e intercadeias de DNA, as quais vão impedir a síntese proteica.

Ambas são excretadas pelos rins, mas a cisplatina apresenta maior nefrotoxicidade que a carboplatina (Lana, 2003), de modo a que, quando se administra este fármaco, é necessário colocar o animal em fluidoterapia de modo a aumentar a diurese e assim, evitar a nefrotoxicidade da cisplatina (Barabas, Milner, Lurie & Adin, 2008).

Além deste efeito adverso, estes fármacos causam também toxicidade gastrointestinal, em que, mais uma vez, a cisplatina causas efeitos mais graves, com episódios de vômito agudo comuns.

Outras toxicidades incluem a mielossupressão, ototoxicidade e neurotoxicidade (Barabas *et al.*, 2008). No caso da cisplatina, esta pode causar mielossupressão moderada (Frimberger, 2005) com neutropénia e trombocitopénia, com um nadir bimodal aos 6 e aos 15 dias após a administração (Lana, 2003). A carboplatina causa mielossupressão severa (Frimberger, 2005), com o nadir a ocorrer entre os 11 e os 14 dias (Lana, 2003).

Estes fármacos são utilizados no tratamento de osteossarcoma, carcinoma de células escamosas e outros carcinomas (Lana, 2003), carcinoma das células de transição, melanoma e tumores de células germinativas no cão (Barabas *et al.*, 2008).

III. INVESTIGAÇÃO CLÍNICA – INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO NO CÃO ONCOLÓGICO: ESTUDO NO HOSPITAL ESCOLAR DA FMV - UTL

III.1. OBJECTIVOS

Como evidenciado na segunda parte deste trabalho, verificou-se que existem alterações imunitárias sistémicas causadas pela doença oncológica. Ora, essas alterações imunitárias afectam células e factores que por sua vez estão envolvidos na resposta imunitária à infecção do tracto urinário.

Por esse motivo e por não ter sido encontrada nenhuma bibliografia que relacionasse a doença oncológica como sendo um possível factor predisponente de ITU, este trabalho teve como objectivos avaliar a presença de infecções do tracto urinário nos pacientes oncológicos da espécie canina. Além disso, tentou-se avaliar se existiria alguma relação entre a presença de doença oncológica, a sujeição desses pacientes a quimioterapia, e o desenvolvimento de ITUs.

III.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a investigação clínica realizada foram definidos dois estudos: o Estudo 1, que foi realizado no Hospital Escolar da FMV – UTL entre 15 de Janeiro de 2010 e 30 de Abril de 2010; e o Estudo 2 que envolveu a análise de casos entre 2003 e o início de Janeiro de 2010.

III.2.1. AMOSTRA POPULACIONAL

III.2.1.1. ESTUDO 1

Aqui foram definidos 3 grupos:

- Grupo ON₁ – este grupo foi constituído de 25 canídeos ($n=25$) saudáveis, ou seja, sem sinais de infecção do tracto urinário e sem qualquer outra doença conhecida. Os animais deste grupo foram escolhidos aleatoriamente, e incluiu animais de ambos os sexos, qualquer idade e raça. Teve a finalidade de representar animais com um sistema imunitário normal e funcionar assim, como um grupo controlo.
- Grupo OS₁ – este grupo foi constituído por 12 canídeos ($n=12$) aos quais foi diagnosticada doença oncológica, mas os quais não foram sujeitos a tratamento quimioterapêutico, ou seja, ou não foi realizado qualquer tratamento antineoplásico ou foram sujeitos a cirurgia e/ou corticoterapia. O diagnóstico definitivo de neoplasia foi realizado por citologia após punção aspirativa por agulha fina (PAAF) ou análise de peça cirúrgica após exerése ou após biopsia, pelo Laboratório de Anatomia Patológica da

Faculdade de Medicina Veterinária – UTL. Aqui foram incluídos animais de ambos os sexos, de várias idades e raças, e com qualquer tipo de neoplasia maligna.

- Grupo OT₁ – este grupo foi constituído por 6 canídeos ($n=6$) com doença oncológica, em que o diagnóstico definitivo foi obtido através dos mesmos métodos referidos para o grupo OS₁, mas neste grupo, os animais incluídos foram submetidos a tratamento quimioterapêutico. Também neste grupo foram incluídos animais de qualquer sexo, raça, idade e neoplasia maligna.

III.2.1.2. ESTUDO 2

Neste estudo foram definidos dois grupos:

- Grupo OS₂ – este grupo foi constituído por 89 canídeos ($n=89$) de ambos os sexos e de qualquer raça e idade, aos quais foi diagnosticada doença oncológica. Também aqui o diagnóstico foi feito por análise citológica após PAAF ou análise histopatológica de peça cirúrgica após exérese ou biópsia, pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária – UTL. Neste grupo os animais não foram submetidos a quimioterapia, sendo apenas submetidos a cirurgia, corticoterapia ou outro tipo de tratamento paliativo.
- Grupo OT₂ – este grupo foi constituído por 13 canídeos ($n=13$) com doença oncológica diagnosticada pelo método utilizado no grupo anterior, submetidos a quimioterapia. Também este grupo englobou animais de qualquer sexo, idade e raça e com qualquer tipo de neoplasia.

III.2.1.3. CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA AMOSTRA (SEXO, IDADE E RAÇA) ($n=145$)

- DISTRIBUIÇÃO SEXUAL

Na amostra de animais saudáveis ($n=25$), houve uma predominância de machos relativamente às fêmeas, com frequências de 68% ($n=17$) e 32% ($n=8$), respectivamente.

Nos animais com doença oncológica que não foram submetidos a quimioterapia (grupos OS₁ e OS₂), verificou-se uma percentagem mais elevada de fêmeas relativamente aos machos, sendo estas de 64,4% ($n=65$) e 35,6% ($n=36$), respectivamente (Gráfico 1).

Relativamente aos grupos OT₁ e OT₂ verificou-se o contrário (Gráfico 2), em que houve uma predominância de machos com uma frequência de 57,9% ($n=11$), tendo as fêmeas uma frequência de 42,1% ($n=8$).

Gráfico 1 – Distribuição sexual dos doentes oncológicos não submetidos a quimioterapia (Grupos OS₁ e OS₂, n=101)

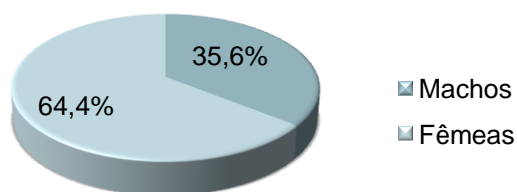
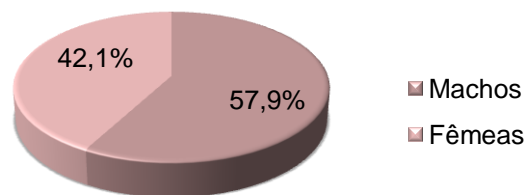


Gráfico 2 – Distribuição sexual dos cães submetidos a quimioterapia (grupos OT₁ e OT₂, n=19)



- IDADE

No grupo ON₁ (n=25), a média das idades dos animais incluídos foi de 5,5 anos, em que estas variaram entre os 2 e os 12 anos de idade.

Como se pode verificar pela análise da Tabela 14, em média os animais desenvolvem a doença oncológica numa idade já avançada, que neste estudo rondou os 10 anos.

No entanto, podemos verificar que tanto nos animais que foram sujeitos a quimioterapia como nos que não foram, os intervalos que compreendiam as idades foram muito alargados, e que, além dos animais idosos, cães muito jovens, com apenas 1 ou 2 anos de idade também foram afectados por esta doença.

Tabela 14 - Distribuição etária dos canídeos na altura do diagnóstico da doença oncológica

Idade na altura do diagnóstico oncológico (Anos)

	Média	Mínimo	Máximo
OT₁	10	8	14
OT₂	7,6	2	11
OS₁	9,9	7	14
OS₂	9,8	1	15

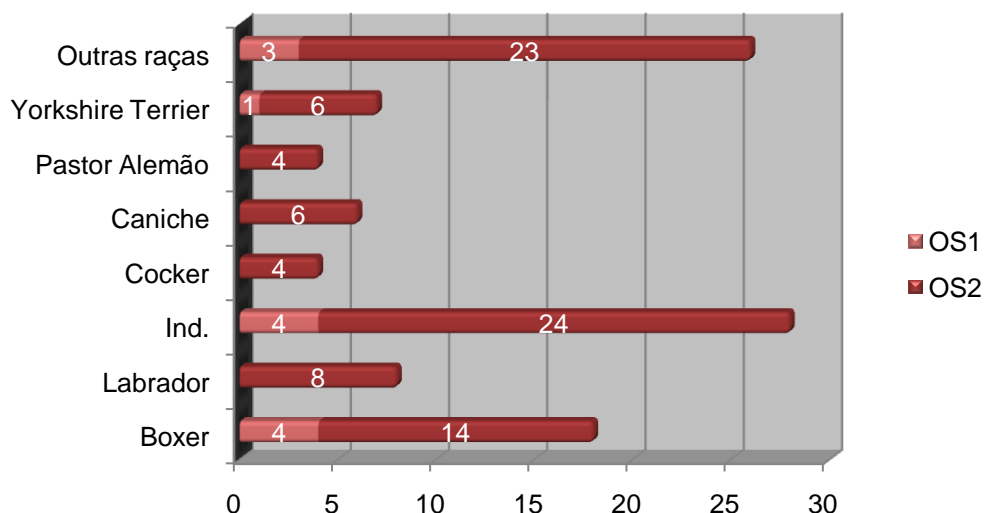
- RAÇA

No grupo de animais saudáveis, o grupo ON₁ (n=25), houve uma predominância de animais de raça indeterminada (n=10), seguida pelos Rottweiler (n=3) e American Staffordshire Terrier (n=3). Também foram incluídos animais das raças Labrador (n=2), Pug (n=2), Cocker Spaniel (n=2), entre outras.

Nos animais com doença oncológica não sujeitos a quimioterapia, ou seja, nos grupos OS₁ e OS₂ (Gráfico 3), existiu uma predominância de animais de raça indeterminada com uma

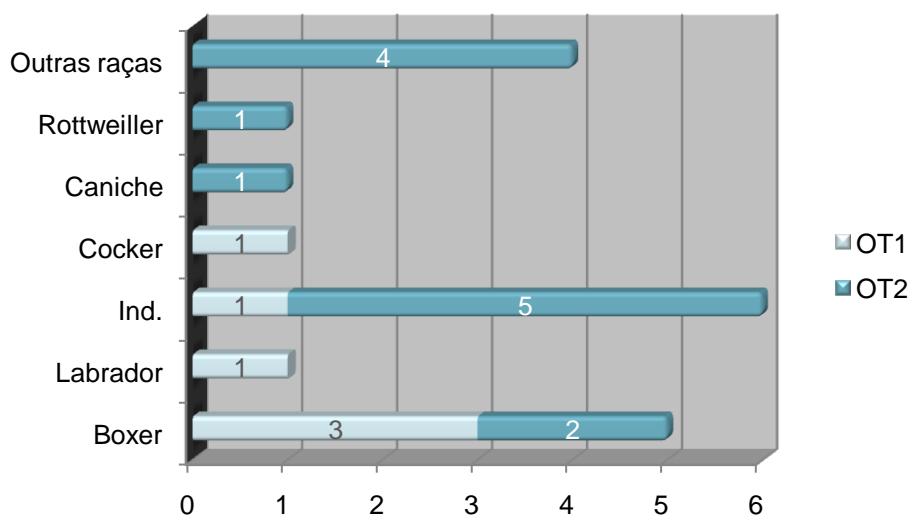
frequência de 27,7% ($n=28$), seguida por animais da raça Boxer e Labrador Retriever, com frequências de 17,8% ($n=18$) e 7,9% ($n=8$), respectivamente.

Gráfico 3 - Raças nos grupos OS₁ e OS₂ ($n=101$)



Nos grupos OT₁ e OT₂ (Gráfico 4), isto é, nos grupos de cães com doença oncológica submetidos a tratamento quimioterapêutico, verificou-se também uma predominância de animais de raça indeterminada com uma frequência de 31,6% ($n=6$), seguida por animais da raça Boxer que mostraram uma frequência de 26,3% ($n=5$). Nos restantes animais, apenas foi encontrado um exemplar de cada raça, que incluiu Labrador Retriever ($n=1$), Cocker Spaniel ($n=1$), Caniche ($n=1$), Rottweiler ($n=1$), entre outras.

Gráfico 4 - Raças nos grupos OT₁ e OT₂ ($n=19$)



III.2.2. RECOLHA DAS AMOSTRAS

III.2.2.1. ESTUDO 1

A todos os animais pertencentes aos grupos ON₁, OS₁ e OT₁ foi colhida urina por jacto livre para copo esterilizado, e aos seus proprietários foi realizado um inquérito (Figura 8) para caracterizar o ambiente envolvente onde o animal vivia, doenças e tratamentos anteriores e, mais especificamente, a ocorrência anterior de alterações relacionadas com o tracto urinário (ITU, cálculos, incontinência), a sujeição a procedimentos cirúrgicos, administração anterior de antibióticos e a administração de fármacos na altura da colheita da amostra.

Relativamente ao grupo ON₁, esta colheita de urina foi realizada apenas uma vez. Por outro lado, aos animais incluídos nos grupos OS₁ e OT₁, as amostras foram colhidas, na maioria dos casos, em vários tempos consoante os animais eram encontrados nas consultas de seguimento (no caso do grupo OS₁), nas sessões de quimioterapia (no caso do grupo OT₁), ou consoante as amostras eram fornecidas pelos donos. Na recepção de cada amostra dos animais pertencentes aos grupos OS₁ e OT₁ era sempre questionado aos donos se tinham observado alguma alteração relacionada com o tracto urinário, como por exemplo, hematúria, alteração do cheiro da urina, polaquiúria, disúria, entre outras (Figura 9).

Relativamente aos animais que eram sujeitos a quimioterapia (grupo OT₁), foram registadas todas as informações consideradas pertinentes acerca das sessões, como alterações do hemograma e o fármaco administrado.

III.2.2.2. ESTUDO 2

Nos grupos OS₂ e OT₂ foi analisado o historial clínico dos animais, no qual estava incluída a anamnese, o diagnóstico de doença oncológica, exames físicos, resultados de exames complementares e tratamentos administrados e prescritos.

No caso dos animais sujeitos a quimioterapia, também constava informação acerca do protocolo utilizado e de cada sessão de tratamento, na qual era sempre realizado um hemograma prévio à administração do agente quimioterapêutico.

Deste modo, na análise da ficha clínica do animal teve-se em especial atenção a data de diagnóstico da neoplasia, o tratamento efectuado, em que no caso de quimioterapia foi registado o início e o término do tratamento e todas as informações relevantes associadas, assim como foram procurados dados e informações relacionadas com ITUs desenvolvidas após o diagnóstico de neoplasia, no caso dos animais do grupo OS₂, e após o diagnóstico de neoplasia e durante o tratamento quimioterapêutico, no caso dos animais do grupo OT₂.

Figura 8 - Inquérito epidemiológico realizado aos proprietários dos animais do Estudo 1

T₂ -Código paciente: _____ Data: _____ ITU no Doente Oncológico

Proprietário: _____

Nome Paciente: _____ Espécie: _____ Raça: _____ Idade: _____ Sexo: _____

- Quando foi adquirido? _____
- Zona onde vive: _____ Cidade ☐ Campo ☐
- Vive: exclusivamente dentro de casa ☐ Quintal/Jardim ☐ Dentro de casa com acesso à rua ☐
- Vive com mais animais? Sim ☐ Não ☐
 - Se sim, quais? Cães ☐ Gatos ☐ Outros _____
- Contacta com outros animais quando vai à rua? Sim ☐ Não ☐
 - Se sim, que tipo? Abandonados ☐ Com dono ☐
- Vacinado ☐ Desparasitado ☐
- Viajou para o estrangeiro como seu animal recentemente? Sim ☐ Não ☐
- Que outras doenças teve anteriormente? _____
- Que tratamento efectuou? _____
- Nos últimos 6 meses, o seu animal fez alguma cirurgia? Sim ☐ Não ☐
 - Se sim, qual? _____
- O seu animal já teve alguma infecção urinária anteriormente? Sim ☐ Não ☐
- O seu animal já teve alguma outra alteração do tracto urinário (cálculos, cristais, incontinência, etc)? Sim ☐ Não ☐ Se sim, qual? _____
- Além da doença oncológica, o seu animal tem alguma outra doença? Sim ☐ Não ☐
 - Se sim, qual? _____
- Profissão dos donos: _____
- Existe, no agregado familiar, algum Profissional de Saúde? Sim ☐ Não ☐
 - Se sim, o que faz? _____
- Existe, no agregado familiar, alguém que esteja doente e por isso se desloque ao hospital com frequência? Sim ☐ Não ☐
- O seu animal tomou algum antibiótico:
 - No último mês: ☐ Não ☐
 - Nos últimos 3 meses: ☐
 - Nos últimos 6 meses: ☐
 - Se sim, qual? _____ Porque razão? _____

Figura 8 – (Continuação)

- Na última semana, notou algum destes sinais no seu animal?

Febre <input type="checkbox"/>	Disúria <input type="checkbox"/> (dificuldade em urinar)	Poliúria <input type="checkbox"/> (aumento da quantidade de urina)
Alteração do cheiro da urina <input type="checkbox"/>	Periúria <input type="checkbox"/> (urinar em locais inapropriados)	Hematúria <input type="checkbox"/> (presença de sangue na urina)
Polaquiúria <input type="checkbox"/> (urinar muitas vezes, pouca quantidade)	Piúria <input type="checkbox"/> (presença de pus na urina)	Dor abdominal <input type="checkbox"/>
Corrimento uretral independente da micção <input type="checkbox"/>		Não <input type="checkbox"/>
- O seu animal toma alguma medicação actualmente?

Sim <input type="checkbox"/> Qual? _____	Não <input type="checkbox"/>
--	------------------------------

Figura 9 - Inquérito realizado ao proprietário na recepção de cada amostra

Código paciente: _____ ITU no Doente Oncológico

Nome paciente: _____ Data: _____ T: _____

Nome proprietário: _____

- Desde a última sessão, notou algum destes sinais no seu animal?

Febre <input type="checkbox"/>	Disúria <input type="checkbox"/> (dificuldade em urinar)	Poliúria <input type="checkbox"/> (aumento da quantidade de urina)
Alteração do cheiro da urina <input type="checkbox"/>	Periúria <input type="checkbox"/> (urinar em locais inapropriados)	Hematúria <input type="checkbox"/> (presença de sangue na urina)
Polaquiúria <input type="checkbox"/> (urinar muitas vezes, pouca quantidade)	Piúria <input type="checkbox"/> (presença de pus na urina)	Dor abdominal <input type="checkbox"/>
Corrimento uretral independente da micção <input type="checkbox"/>		Não <input type="checkbox"/>

III.2.3. UROCULTURA

Após a colheita de cada amostra, foi realizada a urocultura o mais brevemente possível. Nos casos em que esta não foi possível logo após a colheita, a amostra foi colocada a refrigerar. A urocultura foi realizada segundo as normas padrão. Assim, a partir de cada amostra foi semeada a superfície de um meio de não-selectivo – o agar Columbia com 5% de sangue de carneiro – e de um meio selectivo para bacilos gram-negativos – o agar MacConkey

(bioMérieux, Lisboa, Portugal), utilizando ansas esterilizadas de 10µl, de modo a ser possível quantificar o crescimento bacteriano no caso de este ocorrer.

As placas foram colocadas a incubar durante 24 horas, numa estufa a 37°C e em ambiente de aerobiose.

Foi considerado resultado positivo quando o crescimento bacteriano era superior a 10⁵UFC/ml de urina semeada. Como as amostras foram colhidas por jacto livre, foi necessário ter em conta a possibilidade de ocorrência de contaminação por microbiota existente na uretra, prepúcio ou vagina. Desse modo, sempre que ocorria crescimento de 2 ou mais espécies bacterianas diferentes e/ou o crescimento não atingia a quantidade de 10⁵UFC/ml, era considerada a existência de contaminação.

III.2.4. URIANÁLISE

Após a urocultura cada amostra foi submetida a urianálise tipo II, pelo método padrão. Depois de centrifugada durante 6 minutos a 10000 rotações/minuto, foi efectuado o exame físico da amostra no qual foi avaliada a cor, o aspecto, o cheiro, o pH e a densidade. Seguiu-se o exame químico, usando tiras de análise de urina, nas quais foram avaliados vários parâmetros: leucócitos, nitritos, urobilinogénio, proteínas, pH, densidade, corpos cetónicos, bilirrubina e glucose. Destes, a avaliação da quantidade de leucócitos não é fiável, assim como a determinação da densidade específica, por isso, a primeira foi realizada pelo exame microscópico do sedimento e a segunda, pela utilização do refractómetro.

Sendo assim, após o exame químico procedeu-se ao exame microscópico do sedimento. Aqui, com uma ampliação de 400x, foi avaliada a quantidade de leucócitos, eritrócitos e células epiteliais por campo de 400x, e puderam ser observados outros elementos, no caso de existirem, como bactérias, cristais e espermatozóides, entre outros.

III.2.5. IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE UROPATOGÉNICO

A identificação do agente uropatogénico foi realizada, inicialmente pelo reconhecimento macroscópico das colónias, com base na sua morfologia, características de crescimento em meio selectivo ou não, reconhecimento microscópico da sua morfologia e coloração Gram, e prova da oxidase.

Posteriormente foi utilizado o sistema de biotipia “API 20 E” (BioMérieux) para a identificação dos agentes patogénicos, e num caso dúbio, o resultado obtido pelo “API 20 E” foi confirmado pelo “BBL Crystal™ Nonfermenter ID system” (Becton, Dickinson and Company).

III.2.6. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS (TSA)

III.2.6.1. MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

Após a urocultura e isolamento do agente patogénico foi realizado o antibiograma pelo método de difusão em disco.

Para tal foram utilizadas geloses com o meio de Mueller-Hinton (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), nas quais foi efectuada sementeira à superfície utilizando uma zaragatoa previamente mergulhada numa suspensão bacteriana com turvação equivalente à unidade 0,5 da escala de McFarland. Após a realização da sementeira, foram dispostos os discos de antibióticos (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) mencionados na Tabela 15 com as respectivas concentrações.

Posteriormente, as placas foram colocadas a incubar em estufa a 37°C, durante 18-24 horas.

No que diz respeito às *Enterobacteriaceae*, a leitura e interpretação dos diâmetros críticos dos antibióticos foi realizada como também se mostra na Tabela 15, ou seja, sempre que possível, com base nos critérios interpretativos específicos para Medicina Veterinária determinados no documento M31-A3 (CLSI, 2008). Para os antibióticos sem critérios interpretativos nesse documento, foram utilizados critérios de Medicina Humana segundo as normas do documento M100-S16 (CLSI, 2006). Para a amoxicilina foram utilizados os critérios interpretativos constantes no documento do Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia para o antibiograma veterinário (Pascal *et al.*, 2010), já que esses critérios não constavam nas normas dos documentos mencionados anteriormente.

Tabela 15 - Antibióticos utilizados, cargas dos discos e critérios interpretativos (mm) para os halos nos TSAs de *Enterobacteriaceae*

<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> e <i>Klebsiella spp.</i>)									
Antibiótico	Conteúdo do disco	M31-A3 (CLSI, 2008)			M100-S16 (CLSI, 2006)			Pascal <i>et al.</i> , 2010 (CASFM)	
		S	I	R	S	I	R	S	R
Amicacina	30 µg	≥17	15-16	≤14	—	—	—	—	—
Tobramicina	10 µg	—	—	—	≥15	13-14	≤12	—	—
Netilmicina	30 µg	—	—	—	≥15	13-14	≤12	—	—
Gentamicina	10µg	≥16	13-15	≤12	—	—	—	—	—
Amoxicilina	25 µg	—	—	—	—	—	—	≥21	<14
Amoxicilina + Ác. clavulânico	25/10 µg	≥18	14-17	≤13	—	—	—	—	—
Cefalotina	30 µg	≥18	15-17	≤14	—	—	—	—	—

Tabela 15 – (Continuação)

Cefotaxima	30 µg	–	–	–	≥23	15-22	≤14	–	–
Ceftazidima	30 µg	–	–	–	≥18	15-17	≤14	–	–
Cefoxitina	30 µg	–	–	–	≥18	15-17	≤14	–	–
Cefuroxima	30 µg	–	–	–	≥23	15-22	≤14	–	–
Cefovecina ¹	30 µg	≥24	21-33	≤20	–	–	–	–	–
Cefepima	30 µg	–	–	–	≥18	15-17	≤14	–	–
Ácido nalidíxico	30 µg	–	–	–	≥19	14-18	≤13	–	–
Enrofloxacina	5 µg	≥23	17-22	≤16	–	–	–	–	–
Levofloxacina	5 µg	–	–	–	≥17	14-16	≤13	–	–
Ciprofloxacina	5 µg	–	–	–	≥21	16-20	≤15	–	–
Tetraciclina	30 µg	≥19	15-18	≤14	–	–	–	–	–
Nitrofurantoína	300 µg	–	–	–	≥17	15-16	≤14	–	–
Cloranfenicol	30 µg	≥18	13-17	≤12	–	–	–	–	–
Trimetoprim-sulfametoxazol	1,25/23,7 µg	≥16	11-15	≤10	–	–	–	–	–
Imipenem	10 µg	≥16	14-15	≤13	–	–	–	–	–

Relativamente à *S. maltophilia*, a leitura e interpretação dos diâmetros críticos dos antibióticos foi realizada como se mostra na Tabela 16, ou seja, sempre que possível foram utilizados os critérios interpretativos de Medicina Humana constantes no documento M100-S16 (CLSI, 2006), dado que não foram encontrados critérios para esta espécie bacteriana no documento de Medicina Veterinária. Para os antibióticos não mencionados no documento do CLSI, recorreu-se às normas do documento do Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia (Cavallo *et al.*, 2010).

Para esta estirpe foram testados os mesmos antibióticos que para as *Enterobacteriaceae* e com as mesmas cargas, no entanto, para a *S. maltophilia*, ainda existem poucos critérios interpretativos definidos como é possível observar na Tabela 16.

¹ Os critérios interpretativos do TSA pelo método de difusão em disco relativos à cefovecina foram considerados segundo o fabricante.

Tabela 16 - Antibióticos utilizados, cargas dos discos e critérios interpretativos (mm) para os halos no TSA de *S. maltophilia*

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>						
Antibiótico	Conteúdo do disco	M100-S16 (CLSI, 2006)			Cavallo <i>et al.</i> , 2010 (CASFM)	
		Halo (mm)			Halo (mm)	
		S	I	R	S	R
Amicacina	30 µg	–			–	
Tobramicina	10 µg	–			–	
Netilmicina	30 µg	–			–	
Gentamicina	10µg	–			–	
Amoxicilina	25 µg	–			–	
Amoxicilina + Ác. clavulânico	25/10 µg	–			–	
Cefalotina	30 µg	–			–	
Cefotaxima	30 µg	–			–	
Ceftazidima	30 µg	–			–	
Cefoxitina	30 µg	–			–	
Cefuroxima	30 µg	–			–	
Cefovecina	30 µg	–			–	
Cefepima	30 µg	–			–	
Ácido nalidíxico	30 µg	–			–	
Enrofloxacina	5 µg	–			–	
Levofloxacina	5 µg	≥17	14-16	≤13	–	–
Ciprofloxacina	5 µg	–	–	–	≥22	<22
Tetraciclina	30 µg	–	–	–	≥19	<17
Nitrofurantoína	300 µg	–			–	
Cloranfenicol	30 µg	–	–	–	≥23	<19
Trimetoprim-sulfametoxazol	1,25/23,7 µg	≥16	11-15	≤10	–	–
Imipenem	10 µg	–	–	–	≥24	<17

III.2.6.2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A susceptibilidade dos agentes patogénicos isolados aos antibióticos foi determinada também pelas concentrações inibitórias mínimas, utilizando para essa finalidade os painéis de microdiluição DADE MicroScan® NM31 (Siemens, Healthcare Diagnostics Inc., USA). Para auxiliar a inoculação e a rehidratação foram usados os sistemas Prompt™ e RENOK®, respectivamente.

Com o painel DADE MicroScan® NM31, um *kit* desidratado, foram testados, para todos os isolados, todos os agentes antimicrobianos mencionados na Tabela 17.

Com o sistema Prompt™, a partir de uma cultura fresca, foram colhidas 3 colónias bem individualizadas, as quais foram suspensas por agitação no frasco que contém o diluente fornecido pelo fabricante. Essa suspensão foi então colocada no tabuleiro de sementeira e transferida para o painel DADE MicroScan® NM31 utilizando o sistema RENOK®, procedendo-se assim à rehidratação e inoculação do painel.

O painel DADE MicroScan® NM31 foi colocado a incubar em estufa a 37°C durante 18 a 24 horas. Após este período procedeu-se à leitura dos resultados de acordo com as instruções do fabricante, e à sua interpretação.

Para esta última, relativamente às *Enterobacteriaceae*, foram utilizados critérios interpretativos específicos para Medicina Veterinária determinados no documento M31-A3 (CLSI, 2008). Para os antibióticos sem critérios interpretativos específicos para Medicina Veterinária, foram utilizados critérios de Medicina Humana segundo as normas do documento M100-S16 (CLSI, 2006) (Tabela 17).

Tabela 17 - Critérios interpretativos de CIMs para *Enterobacteriaceae*

<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp.)						
Agente antimicrobiano	M31-A3 (CLSI, 2008)			M100-S16 (CLSI, 2006)		
	CIM (µg/mL)			CIM (µg/mL)		
	S	I	R	S	I	R
Amicacina	≤16	15 - 16	≥64	—	—	—
Amoxicilina + Ácido clavulânico	≤8/4	16/8	≥32/16	—	—	—
Ampicilina	≤8	16	≥32	—	—	—
Aztreonam	—	—	—	≤8	16	≥32
Cefazolina	≤8	16	≥32	—	—	—
Cefepima	≤2	4	≥8	—	—	—
Cefotaxima	—	—	—	≤8	16-32	≥64
Cefotaxima + Ác. clavulânico	—					

Tabela 17 – (Continuação)

Cefotetan	–	–	–	≤16	32	≥64
Cefoxitina	–	–	–	≤8	16	≥32
Cefpodoxima	–	–	–	≤2	4	≥8
Ceftazidima	–	–	–	≤8	16	≥32
Ceftazidima + Ác. clavulânico	–					
Cefuroxima	–	–	–	≤4	8-16	≥32
Ciprofloxacina	–	–	–	≤1	2	≥4
Ertapenem	–	–	–	≤2	4	≥8
Gentamicina	–	–	–	≤4	8	≥16
Imipenem	≤4	8	≥16	–	–	–
Meropenem	–	–	–	≤4	8	≥16
Piperacilina ²	≤8	–	>16	–	–	–
Piperacilina + Tazobactam	–	–	–	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ticarcilina	≤16	32-64	≥128	–	–	–
Tobramicina	–	–	–	≤4	8	≥16
Trimetoprim + Sulfametoxazol	≤2/38	–	≥4/76	–	–	–

Como se pode ver na Tabela 17, não existem critérios interpretativos para a associação Cefotaxima + Ácido Clavulânico, nem para Ceftazidima + Ácido Clavulânico. Estas duas combinações têm a finalidade de identificarem a presença de sinergias, e assim a identificação de bactérias produtoras de ESBLs. Deste modo, a presença de sinergia e por isso de uma β -Lactamase de espectro alargado, ocorre quando o valor da CIM da associação é 3 ou mais logaritmos inferior à CIM da cefalosporina em questão.

No que diz respeito à *S. maltophilia*, dado que não existem critérios interpretativos específicos para Medicina Veterinária, foram utilizados critérios de Medicina Humana segundo as normas do documento M100-S16 (CLSI, 2006) e do Comité do Antibiógrama da Sociedade Francesa de Microbiologia (Cavallo *et al.*, 2010), dando preferência aos critérios listados no primeiro documento (Tabela 18).

² Para a piperacilina foram utilizados os critérios interpretativos constantes no documento do Comité do Antibiógrama da Sociedade Francesa de Microbiologia (Cavallo *et al.*, 2010).

Tabela 18 – Critérios interpretativos de CIMs para *S. maltophilia*

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					
Agente antimicrobiano	M100-S16 (CLSI, 2006)			CASFM (Cavallo et al., 2010)	
	CIM (µg/mL)			CIM (µg/mL)	
	S	I	R	S	R
Amicacina	—			—	
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	—			—	
Ampicilina	—			—	
Aztreonam	—			—	
Cefazolina	—			—	
Cefepima	—			—	
Cefotaxima	—			—	
Cefotaxima + Ác. Clavulânico	—			—	
Cefotetan	—			—	
Cefoxitina	—			—	
Cefpodoxima	—			—	
Ceftazidima	≤8	16	≥32	—	
Ceftazidima + Ác. Clavulânico	—			—	
Cefuroxima	—			—	
Ciprofloxacina	—			≤1	>1
Ertapenem	—			—	
Gentamicina	—			—	
Imipenem	—			≤2	>8
Meropenem	—			≤2	>8
Piperacilina	—			—	
Piperacilina + Tazobactam	—			—	
Ticarcilina	—			—	
Tobramicina	—			—	
Trimetoprim + Sulfametoxazol	≤2/38	—	≥4/76	—	

III.2.6.3. CRITÉRIOS INTERPRETATIVOS

Os critérios interpretativos classificam os microrganismos como susceptíveis, intermédios ou resistentes para cada antibiótico testado.

Quando um determinado agente patogénico é considerado “sensível” (S), isso significa que existe uma alta probabilidade de sucesso do tratamento, quando o fármaco for administrado pela via e na dose prevista para determinado tipo de infecção.

A classe “intermédia” (I) promove uma zona de transição entre o “sensível” e o “resistente”, ou seja, uma zona tampão, para evitar discrepâncias de interpretação devido a pequenos erros técnicos, especialmente para os fármacos com pequenas margens de segurança. Nesta categoria são também incluídos os isolados com CIMs de agentes antimicrobianos que atingem níveis plasmáticos e tissulares, e para os quais as taxas de sucesso podem ser inferiores às dos isolados sensíveis. Isto significa que nestes isolados, a eficácia clínica pode ocorrer quando se usa uma dose superior ao normal, ou quando esses fármacos são fisiologicamente concentrados em determinados locais do organismo, como por exemplo, os antibióticos β -lactâmicos na urina.

Quando um isolado é classificado como “resistente” (R), isso significa que ele não é inibido pelas concentrações sistémicas atingidas com as doses e frequências normais, e/ou existem mecanismos de resistência microbianos específicos, e a eficácia clínica desse agente antimicrobiano contra o isolado ainda não foi demonstrada em estudos de tratamento (CLSI, 2006).

III.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o Microsoft® Office Excell 2007 e o SPSS 2009. Este último programa foi utilizado para analisar conjuntamente os dados do Estudo 1 e do Estudo 2, pela aplicação do Teste Exacto de Fisher.

III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1. ESTUDO 1 ($n=18$) – ITU NO CÃO ONCOLÓGICO

Neste estudo foram encontrados 3 pacientes com ITU, todos do grupo OS₁. Pela ordem de desenvolvimento dessas infecções, os pacientes foram designados como Paciente 1, Paciente 2 e Paciente 3. Duas destas infecções, as dos Pacientes 1 e 3, foram detectadas

logo no primeiro contacto com o animal. Relativamente à Paciente 2, esta já estava a ser seguida no estudo quando desenvolveu a ITU.

Os resultados dos inquéritos epidemiológicos realizados aos proprietários dos animais incluídos neste estudo encontram-se sintetizados no Anexo 3: Tabela 34.

- PACIENTE 1

A primeira ITU a ser diagnosticada foi num cão, de raça Yorkshire Terrier, macho, de 13 anos de idade, ao qual, a 4 de Dezembro de 2009, tinha sido diagnosticada a presença de neoplasia testicular, nomeadamente de Leydigomas e seminomas, após orquiectomia e envio da peça cirúrgica para análise no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV – UTL. Assim, a 19 de Janeiro de 2010, quando ele se desloca à consulta externa do Hospital Escolar da FMV, há suspeita de uma possível infecção urinária.

É então colhida urina, por jacto livre para recipiente esterilizado, para a realização de urianálise tipo II e urocultura, e é iniciado o tratamento com Amoxicilina + Ácido clavulânico na dose de 20mg/kg, BID, *per os*, durante 15 dias.

A urianálise tipo II revelou alterações concordantes com uma ITU. Ou seja, na análise microscópica do sedimento, foi identificada leucocitúria pela presença de 8-10 leucócitos/campo de ampliação de 400x, e bacteriúria, em que houve quantificação de bastonetes +++.

A urocultura teve também resultado positivo, com crescimento bacteriano superior a 10^5 UFC/mL, tanto no meio Columbia com 5% de sangue de carneiro, como no meio McConkey.

A realização da galeria bioquímica “API 20 E” (BioMérieux) para a identificação do agente patogénico, revelou a presença de *Klebsiella pneumoniae*, com confiança de 97,7%, a qual se encontra entre os agentes uropatogénicos mais comuns (Graver, 2003) e o tracto urinário é o seu local de infecção de eleição (citado por Rosen *et al.*, 2008).

Dado que a urocultura teve resultado positivo foi realizado TSA, pelo método de difusão em disco e, posteriormente, pela determinação da concentração inibitória mínima, obtendo-se os resultados demonstrados na Tabela 19 e na Tabela 20, respectivamente.

Neste animal não havia história de ITUs anteriores, nem de outras alterações do tracto urinário como incontinência, cristalúria ou urolitíase, nem de algaliasções.

Tabela 19 - Resultados do TSA pelo método de difusão em disco do Paciente 1

Antibiótico	Critérios interpretativos (mm)			Halo (mm)	Resultado
	S	I	R		
Amicacina ³	≥17	15-16	≤14	21	S
Tobramicina ⁴	≥15	13-14	≤12	20	S
Netilmicina ⁴	≥15	13-14	≤12	23	S
Gentamicina ³	≥16	13-15	≤12	18	S
Amoxicilina ⁵	≥21	—	<14	9	R
Amoxicilina + Ác. Clavulânico ³	≥18	14-17	≤13	6	R
Cefalotina ³	≥18	15-17	≤14	22	S
Cefotaxima ⁴	≥23	15-22	≤14	32	S
Ceftazidima ⁴	≥18	15-17	≤14	25	S
Cefoxitina ⁴	≥18	15-17	≤14	22	S
Cefuroxima ⁴	≥23	15-22	≤14	23	S
Cefovecina ⁶	≥24	21-33	≤20	30	S
Cefepima ⁴	≥18	15-17	≤14	25	S
Ácido nalidíxico ⁴	≥19	14-18	≤13	23	S
Enrofloxacin ³	≥23	17-22	≤16	29	S
Levofloxacin ⁴	≥17	14-16	≤13	28	S
Ciprofloxacin ⁴	≥21	16-20	≤15	26	S
Tetraciclina ³	≥19	15-18	≤14	21	S
Nitrofurantoína ⁴	≥17	15-16	≤14	22	S
Cloranfenicol ³	≥18	13-17	≤12	26	S
Trimetoprim-sulfametoxazol ³	≥16	11-15	≤10	30	S
Imipenem ³	≥16	14-15	≤13	28	S

³ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M31-A3 (CLSI, 2008)⁴ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M100-S16 (CLSI, 2006)⁵ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento do Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia para o antibiograma veterinário (Pascal *et al.*, 2010)⁶ Critérios interpretativos consoante o fabricante

Tabela 20 - Resultados do TSA pela determinação da CIM do Paciente 1

Agente antimicrobiano	Critérios interpretativos			CIM obtida (µg/mL)	Resultado
	CIM (µg/mL)				
	S	I	R		
Amicacina ⁷	≤16	15 - 16	≥64	8	S
Amoxicilina + Ácido Clavulânico ⁷	≤8/4	16/8	≥32/16	4/2	S
Ampicilina ⁷	≤8	16	≥32	16	I
Aztreonam ⁸	≤8	16	≥32	1	S
Cefazolina ⁷	≤8	16	≥32	4	S
Cefepima ⁸	≤2	4	≥8	1	S
Cefotaxima ⁸	≤8	16-32	≥64	1	S
Cefotaxima + Ác. Clavulânico	—			0,25	—
Cefotetan ⁸	≤16	32	≥64	16	S
Cefoxitina ⁸	≤8	16	≥32	4	S
Cefpodoxima ⁷	≤2	4	≥8	1	S
Ceftazidima ⁸	≤8	16	≥32	1	S
Ceftazidima + Ác. Clavulânico	—			0,25	—
Cefuroxima ⁸	≤4	8-16	≥32	1	S
Ciprofloxacina ⁸	≤1	2	≥4	0,12	S
Ertapenem ⁸	≤2	4	≥8	0,5	S
Gentamicina ⁷	≤4	8	≥16	2	S
Imipenem ⁷	≤4	8	≥16	1	S
Meropenem ⁸	≤4	8	≥16	2	S
Piperacilina ⁹	≤8	—	>16	8	S
Piperacilina + Tazobactam ⁸	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4	8	S
Ticarcilina ⁷	≤16	32-64	≥128	32	I
Tobramicina ⁸	≤4	8	≥16	2	S
Trimetoprim + Sulfametoxazol ⁷	≤2/38	—	≥4/76	2/38	S

⁷ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M31-A3 (CLSI, 2008)⁸ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M100-S16 (CLSI, 2006)⁹ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento do Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia (Cavallo *et al.*, 2010)

Pela observação da tabela com os resultados do Teste de Susceptibilidade aos Antibióticos pelo método de difusão em disco (Tabela 19), verifica-se resistência à Amoxicilina e à associação Amoxicilina + Ác. Clavulânico. Dado que a determinação das CIMs não é realizada na rotina clínica e neste estudo só foi realizada posteriormente, e esta última molécula era a que tinha sido prescrita para o tratamento desta ITU, quando se obteve o resultado deste teste o tratamento foi alterado para a Enrofloxacina na dose 6mg/kg, SID, *per os*, durante 15 dias.

Ao observar a tabela do TSA pela determinação das CIMs (Tabela 20), não são observados os mesmos resultados que pelo método de difusão em disco, em que neste caso não são observadas nenhuma resistência.

Assim, dando prioridade aos resultados do TSA pela determinação das CIMs, já que este constitui um método mais sensível e fiável na determinação da susceptibilidade aos antibióticos dos agentes patogénicos testados, conclui-se que estamos perante um agente uropatogénico não resistente a nenhum dos agentes antimicrobianos testados.

Deste modo, seria provável que o tratamento com Amoxicilina + Ác. Clavulânico fosse igualmente eficaz, sem necessidade de modificar a terapêutica e prolongar, assim o tratamento.

Quando este paciente volta à consulta, a 8 de Fevereiro de 2010, confirma-se a cura bacteriológica através da realização de uma urocultura de controlo que apresenta resultado negativo. Mas um dos resultados da urianálise tipo II é a microhematúria, com a presença de 8-10 eritrócitos /campo de ampliação 400x. Assim, é aconselhada a manutenção do tratamento até perfazer 20 dias.

- **PACIENTE 2**

A paciente 2 é uma cadela de raça indeterminada, não-ovariohisterectomizada, à qual foi diagnosticado um insulinoma maligno, por análise histopatológica da peça cirúrgica, no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV – UTL, após pancreatectomia parcial a 18 de Dezembro de 2008.

Além do tratamento cirúrgico, esta paciente foi também sujeita a corticoterapia prolongada com prednisolona em dose variável.

Em Abril de 2009, através de ecografia abdominal foi detectada recidiva do insulinoma e metastização hepática.

No dia 23 de Fevereiro de 2010, o proprietário reporta a ocorrência de hematúria e polaquiúria, e dois dias mais tarde, quando se desloca com o seu animal à consulta externa do Hospital Escolar da FMV, é confirmada a existência de uma ITU, após colheita de urina por jacto livre para recipiente esterilizado, e realização urianálise tipo II e urocultura.

Na urianálise, no exame do sedimento foi reportada bacteriúria, com quantificação de bastonetes +++. Na contagem de células foram apenas observados 0-2 leucócitos/campo de

ampliação de 400x. Este último resultado pode dever-se à administração de glucocorticóides, os quais têm diversos efeitos sobre as respostas imunitárias inata e adquirida (Franchimont, 2006).

A urocultura teve resultado positivo, em que foi observado crescimento bacteriano superior a 10^5 UFC/mL nos dois meios utilizados (Columbia com 5% de sangue de carneiro e McConkey), e após identificação com o sistema de biotipia “API 20 E” (BioMérieux) foi identificado como agente patogénico, a *Escherichia coli* com confiança de 85,6%. Como se verifica em diversos estudos, esta bactéria constitui o agente uropatogénico mais comumente isolado neste tipo de infecções (Pomba *et al.*, 2009; Ball *et al.*, 2008).

Antes de se conhecerem os resultados dos TSAs foi iniciado o tratamento com enrofloxacin na dose de 5mg/kg, SID, *per os*, durante 15 dias.

Antes deste episódio, nunca tinha havido história de outras ITUs, assim como, pelo inquérito realizado ao dono, não havia história de outras alterações relacionadas com o tracto urinário, como por exemplo, incontinência, cristalúria e urolitíase.

O TSA realizado pelo método de difusão em disco e pela determinação da concentração inibitória mínima teve os resultados mencionados na Tabela 21 e na Tabela 22, respectivamente.

Tabela 21 - Resultados do TSA pelo método de difusão em disco da Paciente 2

Antibiótico	Critérios interpretativos (mm)			Halo (mm)	Resultado
	S	I	R		
Amicacina ¹⁰	≥17	15-16	≤14	20	S
Tobramicina ¹¹	≥15	13-14	≤12	12	R
Netilmicina ¹¹	≥15	13-14	≤12	11	R
Gentamicina ¹⁰	≥16	13-15	≤12	6	R
Amoxicilina ¹²	≥21	—	<14	Não realizado	
Amoxicilina + Ác. Clavulânico ¹⁰	≥18	14-17	≤13	9	R
Cefalotina ¹⁰	≥18	15-17	≤14	6	R
Cefotaxima ¹¹	≥23	15-22	≤14	12	R
Ceftazidima ¹¹	≥18	15-17	≤14	6	R
Cefoxitina ¹¹	≥18	15-17	≤14	6	R
Cefuroxima ¹¹	≥23	15-22	≤14	6	R
Cefovecina ¹³	≥24	21-23	≤20	6	R

¹⁰ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M31-A3 (CLSI, 2008)

¹¹ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M100-S16 (CLSI, 2006)

¹² Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento do Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia para o antibiograma veterinário (Pascal *et al.*, 2010)

Tabela 21 - (Continuação)

Cefepima ¹¹	≥18	15-17	≤14	27	S
Ácido nalidíxico ¹¹	≥19	14-18	≤13	6	R
Enrofloxacin ¹⁰	≥23	17-22	≤16	6	R
Levofloxacin ¹¹	≥17	14-16	≤13	6	R
Ciprofloxacin ¹¹	≥21	16-20	≤15	6	R
Tetraciclina ¹⁰	≥19	15-18	≤14	6	R
Nitrofurantoína ¹¹	≥17	15-16	≤14	21	S
Cloranfenicol ¹⁰	≥18	13-17	≤12	20	S
Trimetoprim-sulfametoxazol ¹⁰	≥16	11-15	≤10	28	S
Imipenem ¹⁰	≥16	14-15	≤13	26	S

Pela observação da Tabela 21, verifica-se resistência a diversos aminoglicosídeos (tobramicina, netilmicina e gentamicina), à Amoxicilina + Ác. Clavulânico, a cefalosporinas de 1ª (cefalotina), 2ª (cefoxitina, cefuroxima) e 3ª (cefotaxima, ceftazidima e ceftovecina) geração, à quinolona (Ác. Nalidíxico) e às fluoroquinolonas testadas (enrofloxacin, levofloxacin e ciprofloxacin) e à tetraciclina.

Tendo em conta os resultados deste teste, o tratamento foi alterado para a Nitrofurantoína, na dose de 4mg/kg, TID, *per os*, durante 15 dias.

Pela análise da Tabela 22, é possível observar a existência de resistência a diversos β-lactâmicos (ampicilina, piperacilina, ticarcilina, cefazolina, cefoxitina, cefpodoxima, cefuroxima e ceftazidima), à associação Amoxicilina + Ác. Clavulânico, à fluoroquinolona testada (ciprofloxacin) e aos aminoglicosídeos gentamicina e tobramicina.

Tabela 22 - Resultados do TSA pela determinação da CIM da Paciente 2

Agente antimicrobiano	Critérios interpretativos			CIM obtida (µg/mL)	Resultado
	CIM (µg/mL)				
	S	I	R		
Amicacina ¹⁴	≤16	15 - 16	≥64	8	S
Amoxicilina + Ácido clavulânico ¹⁴	≤8/4	16/8	≥32/16	>16/8	R
Ampicilina ¹⁴	≤8	16	≥32	>16	R
Aztreonam ¹⁵	≤8	16	≥32	16	I

¹³ Critérios interpretativos consoante o fabricante

¹⁴ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M31-A3 (CLSI, 2008)

¹⁵ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M100-S16 (CLSI, 2006)

Tabela 22 – (Continuação)

Cefazolina ¹⁴	≤8	16	≥32	>16	R
Cefepima ¹⁵	≤2	4	≥8	1	S
Cefotaxima ¹⁵	≤8	16-32	≥64	16	I
Cefotaxima + Ác. clavulânico	–			8	–
Cefotetan ¹⁵	≤16	32	≥64	16	S
Cefoxitina ¹⁵	≤8	16	≥32	>16	R
Cefpodoxima ¹⁴	≤2	4	≥8	>4	R
Ceftazidima ¹⁵	≤8	16	≥32	64	R
Ceftazidima + Ác. clavulânico	–			32	–
Cefuroxima ¹⁵	≤4	8-16	≥32	>16	R
Ciprofloxacina ¹⁵	≤1	2	≥4	>2	R
Ertapenem ¹⁵	≤2	4	≥8	0,5	S
Gentamicina ¹⁴	≤4	8	≥16	>8	R
Imipenem ¹⁴	≤4	8	≥16	1	S
Meropenem ¹⁵	≤4	8	≥16	2	S
Piperacilina ¹⁶	≤8	–	>16	>64	R
Piperacilina + Tazobactam	≤16/4	32/4- 64/4	≥128/ 4	8	S
Ticarcilina ¹⁴	≤16	32-64	≥128	>64	R
Tobramicina ¹⁵	≤4	8	≥16	>8	R
Trimetoprim + Sulfametoxazol ¹⁴	≤2/38	–	≥4/76	2/38	S

Tendo em conta as resistências demonstradas, podemos concluir estar na presença de uma *Escherichia coli* multi-resistente, já que exibe resistência a mais de 3 classes diferentes de antibióticos, e produtora de uma cefalosporinase, já que o agente isolado é resistente à cefamicina Cefoxitina e demonstra também resistência ao inibidor das β-lactamases, o Ácido Clavulânico. Podemos também concluir que não estamos perante uma bactéria produtora de ESBLs, porque a CIM da associação cefalosporina + Ác. Clavulânico é apenas um logaritmo inferior à CIM da cefalosporina correspondente. Este tipo de resistência encontrado, nomeadamente a resistência às fluoroquinolonas, e a evidência da presença de uma cefalosporinase, tem sido reportado em diversos estudos anteriores (Drago *et al.*, 2010;

¹⁶ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento do Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia (Cavallero *et al.*, 2010)

Tenover, 2006). Além desses, num estudo realizado em Portugal (Pomba, Delgado, Peixoto, Costa & Correia, 2007), também se verificou a existência de estirpes de *E. coli* uropatogénicas produtoras de cefalosporinases, em que 4 em cada 5 estirpes eram produtoras desta molécula.

Neste caso, os resultados do TSA pelo método de difusão em disco e pela determinação das CIMs foram concordantes, portanto, verificou-se que a alteração do tratamento foi realmente necessária.

Posteriormente, quando esta paciente voltou à consulta no Hospital Escolar da FMV, a 8 de Abril de 2010, foi confirmada a cura clínica e a cura bacteriológica pela realização de uma urocultura de controlo com resultado negativo e de urianálise tipo II, com todos os resultados dentro dos parâmetros normais.

- PACIENTE 3

Este paciente é um canídeo macho, não-orquiectomizado, de raça Pointer, com 16 anos de idade.

Em Setembro de 2008, através de ecografia abdominal houve suspeita de uma neoplasia hepática, a qual foi confirmada posteriormente através de biópsia ecoguiada e análise pelo Laboratório de Anatomia Patológica da FMV, como sendo um hepatoma maligno.

Ainda em 2008, ele desenvolve uma ITU, a qual é tratada com Amoxicilina + Ácido Clavulânico na dose de 20mg/kg, BID, *per os*, durante 15 dias.

A 30 de Março de 2010, ele volta a demonstrar sinais de ITU, sendo então colhida urina por jacto livre para um recipiente estéril e realizada urianálise tipo II e urocultura, tendo estas resultados concordantes com uma ITU.

Na urianálise foi observada leucocitúria e bacteriúria, pelo exame microscópico do sedimento, com 20-30 leucócitos/campo de ampliação de 400x e bastonetes +++, respectivamente.

A urocultura teve crescimento bacteriano superior a 10^5 UFC/ml nos dois meios utilizados, e pelo sistema de biotipia “API 20 E” (BioMérieux) foi identificada a presença de *Stenotrophomonas maltophilia*, com uma confiança de 80,5%. Neste caso, este resultado foi confirmado pela realização de outro sistema de identificação, o “BBL Crystal™ Nonfermenter ID system” (Becton Dickinson, Quilaban, Lisboa, Portugal), que mais uma vez identificou a presença de *S.maltophilia* com confiança de 99,99%. Este agente tem sido identificado como causa de ITU (citado por Denton & Kerr, 1998), mas não se encontra entre os isolados mais frequentes de ITU em canídeos (Tabela 1), apesar de num estudo recente realizado em Humanos sobre ITUs complicadas, este agente ter sido dos mais frequentemente isolados (Shigemura *et al.*, 2009).

Os resultados dos TSAs pelo método de difusão em disco e pela determinação da CIM encontram-se abaixo na Tabela 23 e Tabela 24, respectivamente.

Pela análise da Tabela 23, é possível verificar a existência de resistência à Tetraciclina, ao Cloranfenicol e ao Imipenem, e susceptibilidade às fluoroquinolonas (Levofloxacina e Ciprofloxacina) e ao Trimetoprim-sulfametoxazol.

Tabela 23 - Resultados do TSA pelo método de difusão em disco do Paciente 3

Antibiótico	Critérios interpretativos (mm)			Halo (mm)	Resultado
	S	I	R		
Levofloxacina ¹⁷	≥17	14-16	≤13	28	S
Ciprofloxacina ¹⁸	≥22	—	<22	30	S
Tetraciclina ¹⁸	≥19	—	<17	15	R
Cloranfenicol ¹⁸	≥23	—	<19	16	R
Trimetoprim-sulfametoxazol ¹⁷	≥16	11-15	≤10	34	S
Imipenem ¹⁸	≥24	—	<17	6	R

Pela observação da Tabela 24, verifica-se resistência à Ceftazidima, à Ciprofloxacina e aos carbapenemos, e susceptibilidade ao Trimetoprim-sulfametoxazol.

Tabela 24 - Resultados do TSA pela determinação da CIM do Paciente 3

Agente antimicrobiano	Critérios interpretativos			CIM obtida (µg/mL)	Resultado
	CIM (µg/mL)				
	S	I	R		
Ceftazidima ¹⁷	≤8	16	≥32	128	R
Ceftazidima + Ác. clavulânico	—			>32	—
Ciprofloxacina ¹⁸	≤1	—	>1	2	R
Imipenem ¹⁸	≤2	—	>8	>4	R
Meropenem ¹⁸	≤2	—	>8	>8	R
Trimetoprim + Sulfametoxazol ¹⁷	≤2/38	—	≥4/76	2/38	S

¹⁷ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento M100-S16 (CLSI, 2006)

¹⁸ Critérios interpretativos consoante as normas constantes no documento do Comité do Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia (Cavallo *et al.*, 2010)

Neste paciente, após o diagnóstico da ITU, foi iniciado o tratamento com Amoxicilina + Ác. Clavulânico na dose de 13,5mg/kg, BID, *per os*, durante 15 dias. Não existem critérios interpretativos relativos a este antibiótico, por isso não foi possível testar o isolado para a susceptibilidade a este fármaco.

Por um lado conhece-se a existência de resistência inata da *S. maltophilia* aos antibióticos β -lactâmicos (Valdezate *et al.*, 2001) mas por outro, há estudos que demonstram a susceptibilidade de estirpes de *S. maltophilia* à combinação com inibidores das β -lactamases, nomeadamente à Ticarcilina + Ác.clavulânico. No estudo de Valdezate *et al.* (2001), houve resistência aos β -lactâmicos como previsto, mas a adição de clavulanato reverteu a resistência à ticarcilina em 27,3% das estirpes. Assim, não é possível prever o comportamento desta estirpe relativamente à terapêutica instituída.

Quando este animal volta à consulta no dia 5 de Abril de 2010, foi observada a cura clínica, e posteriormente, no dia 21 de Abril de 2010, foi confirmada a cura bacteriológica pela realização de uma urianálise tipo II, na qual todos os parâmetros se revelaram dentro dos intervalos normais, mostrando a eficácia da terapêutica administrada.

As possíveis justificações para este facto, podem ser a acumulação do antibiótico na urina, como acontece com a administração de β -lactâmicos (CLSI, 2006), e/ou a susceptibilidade desta estirpe ao inibidor das β -lactamases.

Confrontando os resultados obtidos pelo método de difusão em disco com os obtidos pela determinação das CIMs, verifica-se que estes são concordantes, à excepção da ciprofloxacina que mostrou resistência pelo método de determinação da CIM.

Confirma-se assim estar na presença de uma estirpe resistente a uma cefalosporina de 3^a geração, e por isso também resistente às gerações anteriores, à Ciprofloxacina e aos carbapenemos Imipenem e Meropenem. Estes resultados estão de acordo com os resultados de estudos anteriores, que demonstram a resistência inata da *S. maltophilia* aos β -lactâmicos (Zhang *et al.*, 2000) e assim, à Ceftazidima e aos carbapenemos. Esta resistência foi também observada recentemente num estudo (Gülmez *et al.*, 2010), que além dessas, demonstrou também a existência de resistência à Ciprofloxacina, tal como também se verificou no estudo desta dissertação. No entanto o uso de fluoroquinolonas mais recentes, como a Levofloxacina, já demonstrou alguma eficácia, em que 90% dos isolados testados foram inibidos com concentrações muito inferiores às necessárias no caso da Ciprofloxacina (Valdezate *et al.*, 2001).

Verificou-se também que esta estirpe de *S. maltophilia* não é produtora de ESBLs, através da ausência de sinergia, já que a CIM da Ceftazidima + Ác. Clavulânico é apenas dois logaritmos inferior à CIM da cefalosporina correspondente.

Relativamente ao Trimetoprim-sulfametoxazol, apesar desta combinação ser bacteriostática, este é considerado o fármaco de eleição para o tratamento de infecções por *S. maltophilia*, já que apresenta baixas taxas de resistência (Valdezate *et al.*, 2001).

Assim, a susceptibilidade deste isolado ao Trimetoprim-sulfametoxazol era esperada e está de acordo com outros estudos (Gülmez *et al.*, 2010), em que este fármaco foi dos que revelou maior eficácia contra a *S. maltophilia*. No entanto, tem-se verificado também a existência de algumas estirpes resistentes a este fármaco (Gales *et al.*, 2001).

No caso deste isolado, foram testados os mesmos agentes antimicrobianos utilizados para os isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*. No entanto, actualmente para a *S. maltophilia* estão apenas determinados os critérios interpretativos mencionados nas tabelas 23 e 24, e assim só esses resultados foram mencionados.

À medida que a frequência de infecções nosocomiais graves causadas pela *S. maltophilia* aumentava (Carrol *et al.*, 1998), assim como a taxa de insucesso terapêutico e a mortalidade (citado por Gülmez *et al.*, 2010), a resistência presente neste organismo forçou os laboratórios a rever e redefinir os métodos de testagem da susceptibilidade (Carrol *et al.*, 1998).

Outros investigadores demonstraram inconsistências entre vários métodos de testagem da susceptibilidade aos antibióticos, em que os resultados dos diversos métodos para o mesmo antibiótico testado não eram consistentes (Gülmez *et al.*, 2010).

Inicialmente, em versões anteriores dos documentos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), a *S. maltophilia* estava incluída no grupo da *Pseudomonas aeruginosa* e outros bacilos gram-negativos não fermentadores. Posteriormente, verificou-se que a *S. maltophilia* possuía um comportamento diferente das outras bactérias desse grupo, sendo então separada, e iniciou-se a tentativa de determinação dos métodos de testagem e dos parâmetros interpretativos adequados (Rennie, 2004). Desde então, têm decorrido vários estudos de diferentes autores que comparam diversos métodos de testagem e a susceptibilidade da *S. maltophilia* a vários antibióticos (Nicodemo, Araujo, Ruiz & Gales, 2004; Gülmez *et al.*, 2010).

Os testes de susceptibilidade aos antibióticos para os isolados de *S. maltophilia* têm mostrado alguns problemas, como por exemplo a existência de colónias no interior dos halos de inibição no método de difusão em disco, dificuldade na leitura dos resultados das CIMs ao fim de 24 horas (Pankuch, Jacobs, Rittenhouse & Appelbaum, 1994), variação da susceptibilidade aos β -lactâmicos consoante o meio utilizado (citado por Livermore, Hope, Brick, Lillie & Reynolds, 2008) e, para muitos antibióticos, os critérios interpretativos ainda não foram estabelecidos relativamente a este microrganismo (Gülmez *et al.*, 2010).

Até agora ainda só estão definidos, pelo CLSI, critérios para a testagem da minociclina, levofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol pelo método de difusão em disco, e, adicionalmente, da ticarcilina + ácido clavulânico, ceftazidima e cloranfenicol para o método de microdiluição (Gülmez *et al.*, 2010).

III.3.2. ESTUDO 2 ($n=102$) – ITU NO CÃO ONCOLÓGICO

No estudo 2 ($n=102$), apenas foi identificada uma ITU numa paciente do grupo OS₂, ou seja, com doença oncológica mas que não tinha sido sujeita a quimioterapia. Esta paciente foi designada de Paciente 4.

- PACIENTE 4

Esta paciente é uma cadela da raça Caniche, com 12 anos de idade, não ovário-histerectomizada, à qual, em Outubro de 2003 foi diagnosticado um carcinoma mamário após mastectomia e envio da peça cirúrgica para análise histopatológica.

Em Julho de 2005, ela apresenta hematuria e é prescrita Amoxicilina + Ác. Clavulânico na dose de 12,5mg/kg, TID, *per os*, durante 15 dias.

Na urianálise houve evidência de cheiro fétido ao exame físico e mais de 300 eritrócitos /campo de ampliação 400x e 25-30 leucócitos /campo de ampliação de 400x no exame microscópico do sedimento.

Foi também realizada urocultura, na qual houve isolamento de *Staphylococcus pseudintermedius*, um dos agentes uropatogénicos mais frequentemente isolados neste tipo de infecção (Ball *et al.*, 2008), numa quantidade superior a 10⁵UFC/ml, e verificou-se resistência à Penicilina e à Ampicilina após a realização de TSA pelo método de difusão em disco.

Perante o antibiograma obtido foi possível concluir tratar-se de uma estirpe produtora de β -lactamases, mais especificamente, uma penicilinase.

Estes foram os únicos resultados encontrados na análise da ficha clínica desta paciente, e assim, não parece sido realizado o TSA pela determinação das CIMs, para confirmação dos resultados obtidos no TSA pelo método de difusão em disco.

III.3.3. INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO NO DOENTE ONCOLÓGICO COM E SEM QUIMIOTERAPIA ($n=120$)

III.3.3.1. NEOPLASIAS NO ESTUDO 1 ($n=18$)

No caso do grupo OS₁ ($n=12$), ou seja, o grupo de canídeos oncológicos não submetidos a quimioterapia, podemos verificar pela Tabela 25 que as neoplasias encontradas com maior frequência foram o carcinoma mamário ($n=2$) e o mastocitoma ($n=2$), seguidas por outras neoplasias com menor frequência ($n=1$), como por exemplo, o tumor testicular como seminoma e Leydigoma, o condrossarcoma e o insulinooma maligno.

Relativamente aos cães que estavam sob tratamento quimioterapêutico, ou seja, o grupo OT₁, tal como representado na Tabela 26 foram seguidos 2 animais com linfoma ($n=2$). As restantes neoplasias encontradas neste grupo foram o mastocitoma, o condrossarcoma, o glioma e o fibrossarcoma, em que cada uma foi representada por apenas um animal ($n=1$).

Tabela 25 – Neoplasias observadas no grupo OS₁ ($n=12$)

Neoplasia	<i>n</i>
Carcinoma mamário	2
Mastocitoma	2
Tumor testicular	1
Tumor ósseo/cartilágneo	1
Outras	6

Tabela 26 – Neoplasias observadas no grupo OT₁ ($n=6$)

Neoplasia	<i>n</i>
Linfoma	2
Mastocitoma	1
Condrossarcoma	1
Glioma	1
Fibrossarcoma	1

Como referido na revisão bibliográfica desta dissertação, existem poucos estudos em Medicina Veterinária que forneçam informação acerca da incidência e tipo de neoplasias nos cães. E além disso, é necessário ter em atenção a dimensão muito reduzida destes dois grupos, a qual não permite indicar uma frequência das neoplasias que seja representativa da população.

No entanto, as neoplasias encontradas no Estudo 1, nomeadamente, o carcinoma mamário, o mastocitoma e o linfoma, encontram-se entre as mencionadas noutros estudos (Brønden *et al.*, 2010b e Salvado, 2010) como sendo das encontradas com maior frequência nos canídeos domésticos.

III.3.3.2. NEOPLASIAS NO ESTUDO 2 ($n=102$)

A distribuição das neoplasias no grupo OS₂ encontra-se resumida na Tabela 27 e no Gráfico 5.

Foi possível verificar que houve uma predominância de animais com carcinoma mamário, em que 33,7% ($n=30$) dos animais incluídos neste estudo possuíam apenas esta neoplasia. Além destes, ainda foram encontrados animais com a ocorrência concomitante de outra neoplasia, como o mastocitoma e o fibrossarcoma, com a frequência de 5,6% ($n=5$) e 2,2% ($n=2$), respectivamente.

Depois do carcinoma mamário, a neoplasia mais frequente neste grupo foi o mastocitoma, em que 18% ($n=16$) dos animais estudados neste grupo eram portadores deste tumor. Como já referido acima, foram encontrados animais com mastocitoma e carcinoma mamário simultaneamente, e além disso, foi também encontrado um animal ($n=1$) com seminoma, além de mastocitoma.

Mais uma vez, também neste grupo a predominância do carcinoma mamário, seguida pelo mastocitoma encontra-se de acordo com outros estudos realizados recentemente (Salvado, 2010 e Brønden *et al.*, 2010b).

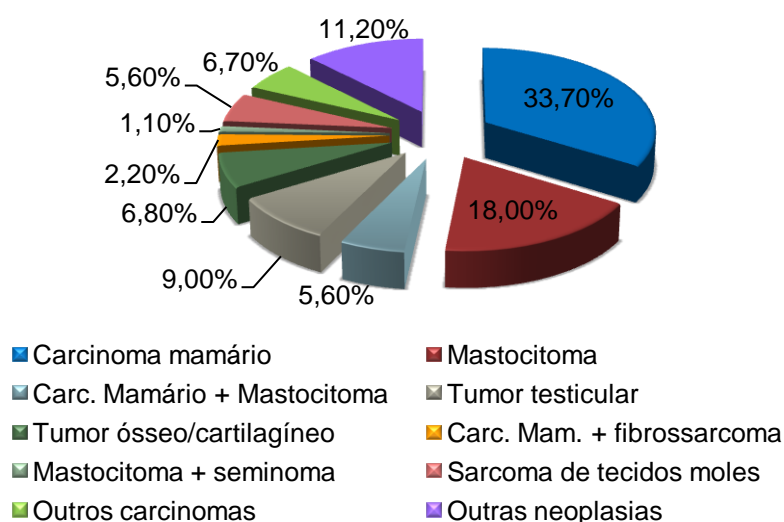
Seguiram-se os tumores testiculares, mais especificamente, os seminomas, leydigomas e sertolinomas, os quais afectaram 9,0% ($n=8$) dos animais incluídos neste grupo, não contando com o animal já referido como tendo além de seminoma, um mastocitoma. A localização testicular foi também, no trabalho de Salvado (2010), umas das localizações mais frequentes de neoplasia em canídeos, embora não tenha tido uma frequência tão elevada. Isto pode dever-se ao facto de a amostra considerada nesta dissertação ser muito reduzida comparativamente à utilizada no estudo anterior.

Com frequências inferiores, foram encontrados tumores ósseos e cartilagíneos ($n=6$), sarcomas de tecidos moles ($n=5$), que incluíram o hemangiossarcoma ($n=3$), leiomiossarcoma ($n=1$) e sarcoma histiocitário ($n=1$), outros carcinomas ($n=6$), que não o carcinoma mamário, e por fim outras neoplasias, como o histiocitoma maligno ($n=2$), melanoma maligno ($n=3$), entre outras.

Tabela 27 – Distribuição das neoplasias no grupo OS₂ ($n=89$)

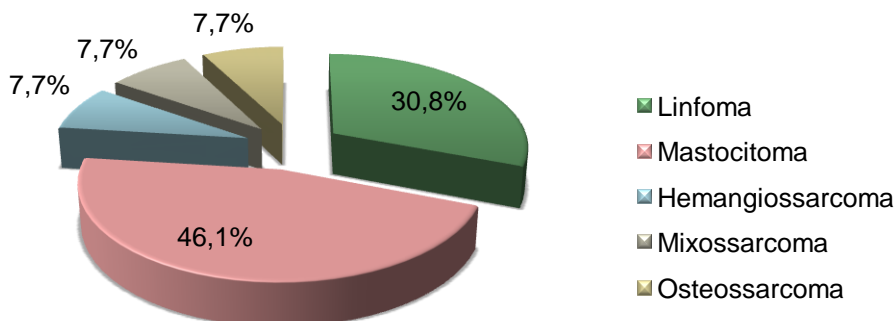
Neoplasia	<i>n</i>
Carcinoma mamário	30
Mastocitoma	16
Carc. Mamário + Mastocitoma	5
Tumor testicular	8
Tumor ósseo/cartilagíneo	6
Carc. mamário + fibrossarcoma	2
Mastocitoma + seminoma	1
Sarcoma de tecidos moles	5
Outros carcinomas	6
Outras neoplasias	10

Gráfico 5 – Frequência das neoplasias no grupo OS₂ ($n=89$)



Relativamente aos animais submetidos a quimioterapia (Gráfico 6), isto é, os animais pertencentes ao grupo OT₂, 46,1% ($n=6$) dos animais tinham mastocitoma e 30,8% ($n=4$) tinham linfoma. Foram ainda encontradas outras neoplasias neste grupo como o hemangiossarcoma ($n=1$), o mixossarcoma ($n=1$) e o osteossarcoma ($n=1$).

Gráfico 6 - Distribuição das neoplasias no grupo OT₂ ($n=13$)



III.3.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO NO CÃO ONCOLÓGICO COM E SEM QUIMIOTERAPIA ($n=120$)

Para a análise estatística da ITU no cão oncológico foi aplicado o Teste Exacto de Fisher, utilizando o *software* SPSS (2009), à Tabela 28, em que foram comparados, conjuntamente, os grupos OT₁ e OT₂ com os grupos OS₁ e OS₂.

Tabela 28 - Tabela de contingência utilizada no Teste Exacto de Fisher

	Pacientes com ITU	Pacientes sem ITU	Total
Doentes Oncológicos com Quimioterapia (OT ₁ + OT ₂)	0/19	19/19	19
Doentes Oncológicos sem Quimioterapia (OS ₁ + OS ₂)	4/101	97/101	101
Total	4/120	116/120	120

Pela implementação do referido teste foi possível verificar que não há diferença estatisticamente significativa ($p=1$) entre os animais submetidos a quimioterapia e os não submetidos a este tipo de tratamento, relativamente ao desenvolvimento de ITUs.

Como demonstrado na revisão bibliográfica desta dissertação, no doente oncológico há uma alteração do sistema imunitário, que é comumente observada nos animais com doença oncológica sob a forma de imunossupressão (Tizard, 2004).

Existem diversos estudos relacionados com a imunossupressão causada pela doença oncológica. Está descrito que esta ocorre através da alteração das células envolvidas na resposta imunitária (Pinzon-Charry *et al.*, 2005), incluindo células dendríticas (Bennaceur *et al.*, 2009) e macrófagos (Walker *et al.*, 1994), no que diz respeito a vários parâmetros como a diferenciação, maturação, função e migração dessas células, podendo estas alterações ser causadas pelas células tumorais, por factores solúveis produzidos por estas ou por células recrutadas ao local do tumor, que vão afectar as células imunitárias, quer localmente (Taylor *et al.*, 2006), quer sistemicamente (Bennaceur *et al.*, 2009).

Além destas alterações, já foram observadas também alterações nos números de células imunitárias circulantes. Tanto nos Humanos (Kosmaczewska *et al.*, 2008) como nos canídeos (Biller *et al.*, 2007) foi observado um aumento do número de células Treg circulantes relativamente a indivíduos saudáveis, as quais produzem efeitos imunossupressores (Cools *et al.*, 2008). Adicionalmente, existe diminuição das células T CD8⁺ e células B em cães com doença oncológica (O'Neill *et al.*, 2009).

Assim, existe a possibilidade de a resposta à infecção no doente oncológico estar alterada e, desse modo, ser menos eficiente.

Relativamente à resposta imunitária contra a infecção do tracto urinário estão envolvidas várias células, incluindo monócitos (Sivick *et al.*, 2010), macrófagos (Engel *et al.*, 2006) e células dendríticas (John & Nelson, 2007) em que estas últimas estão intimamente relacionadas com a activação e função das células T (Münz *et al.*, 2005).

Todas estas células mencionadas, por sua vez, foram também mencionadas na imunossupressão causada pela doença oncológica, como estando alteradas/suprimidas.

Assim, poderá ser possível que a resposta imunitária contra a ITU esteja alterada no doente oncológico.

Neste estudo, foram observadas poucas ITUs nos cães com doença oncológica. No entanto é necessário ter em conta o tamanho da amostra utilizada, o qual era muito reduzido. Por isso, para se poderem tirar conclusões será necessário continuar o estudo, acompanhando alguns animais por um período mais prolongado e aumentando o tamanho da amostra.

Adicionalmente aos efeitos imunossupressores da doença oncológica, os animais sujeitos a tratamento quimioterapêutico estão sujeitos aos efeitos mielossupressores dos fármacos citotóxicos utilizados.

Assim, talvez pudéssemos esperar uma maior frequência de ITUs nestes últimos, comparativamente aos animais que não foram submetidos a quimioterapia e encontrar também uma diferença significativa entre os dois grupos (OS e OT). No entanto, como já mencionado acima, esta diferença não se verificou ($p=1$), o que pode ter como explicação o tamanho muito reduzido da amostra, principalmente o tamanho dos grupos OT₁ e OT₂, e também o facto de em Medicina Veterinária o tratamento quimioterapêutico ser principalmente paliativo de modo a fornecer qualidade de vida ao paciente, e realizado de

modo a evitar os efeitos secundários dos fármacos utilizados. Sendo assim, as doses e os protocolos de quimioterapia não são tão intensos como os utilizados em Medicina Humana, daí que os efeitos secundários deste tratamento não sejam tão acentuados (Frimberger, 2005).

Assim, para obter resultados fidedignos e representativos da população canina oncológica será necessário, mais uma vez, prolongar este estudo de modo a aumentar o tamanho da amostra.

III.4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a presença de infecções do tracto urinário (ITUs) em cães com doença oncológica e submetidos ou não a tratamento quimioterapêutico.

Verificou-se que as neoplasias mais frequentemente encontradas foram o carcinoma mamário, seguida pelo mastocitoma no caso dos animais não sujeitos a quimioterapia. No caso dos animais submetidos a quimioterapia, foram o mastocitoma seguido pelo linfoma. Todos estes resultados se encontram de acordo com outros estudos realizados.

Relativamente às ITUs, apenas foram detectadas três no grupo OS₁ e uma no grupo OS₂, ou seja, apenas nos pacientes não submetidos a quimioterapia. Em todas elas foi isolado um agente patogénico diferente (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus pseudintermedius*) com diferentes padrões de resistência aos antibióticos. Pela análise dos resultados dos testes de susceptibilidade aos antibióticos (TSAs) da *E. coli* e *S. maltophilia* é possível concluir que estamos perante agentes patogénicos multi-resistentes, o que confirma a existência destes nos nossos animais e contribui assim para a crescente preocupação relativa à emergência deste tipo de agentes patogénicos, que tornam os tratamentos cada vez mais difíceis devido à possibilidade de escolha de antibióticos cada vez mais reduzida.

Estes resultados demonstram também a necessidade de realizar uroculturas e TSAs, pois cada vez mais existem estirpes resistentes aos antibióticos usualmente utilizados neste tipo de infecções. Além disso, verificou-se também que o método de determinação das concentrações inibitórias mínimas é preferível ao método de difusão em disco, pois, o primeiro é mais sensível e fiável.

A ausência de ITUs nos grupos OT₁ e OT₂ pode ser explicada pelo tamanho reduzido da amostra. Nos animais domésticos, o tratamento quimioterapêutico tem principalmente o objectivo de melhorar a qualidade de vida, e assim, indirectamente prolongar a vida do animal, já que a eutanásia é adiada. Deste modo, os protocolos terapêuticos utilizados são pouco agressivos, evitando os efeitos secundários indesejados, onde também se incluem os

efeitos citotóxicos sobre a medula, nomeadamente a mielossupressão. Esta, aliada à dimensão reduzida destes grupos, poderá ser também uma razão para não terem sido detectadas ITUs nestes animais.

A ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos OT₁ e OT₂ e OS₁ e OS₂ vem reforçar a necessidade de uma amostra maior.

Conclui-se assim, a presença de ITUs nos pacientes oncológicos, e que é necessário estar alerta para a possibilidade de ocorrência de multi-resistências, que muitas vezes tornam os tratamentos difíceis e ineficazes. Reforça-se, assim, a necessidade de realizar uroculturas e TSAs (preferencialmente pela determinação das CIMs) de modo a utilizar os antibióticos mais apropriados e evitar a emergência de novas resistências.

IV.BIBLIOGRAFIA

- Albers, A., Ferris, R., Kim, G., Chikamatsu, K., DeLeo, A. & Whiteside, T. (2005) Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites [abstract]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 54 (11). 1072-1081.
- Almand, B., Resser, J., Lindman, B., Nadaf S., Clark, J., Kwon, E., Carbone, D. & Gabrilovich D. (2000) Clinical significance of defective dendritic cell differentiation. *Clinical Cancer Research*. 6 (5). 1755-1766.
- Andrews, J. M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (S1). 5-16
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E. & Romagnani, S. (2002) Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4+CD25+ human thymocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 196 (3). 379-387
- Argyle, D. (2008) What is new in canine and feline lymphoma. In *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress*. Dublin, Ireland
- Bacon, N., Ehrhart, N., Dernell, W., Lafferty, M. & Withrow, S. (2008) Use of alternating administration of carboplatin and doxorubicin in dogs with microscopic metastases after amputation for appendicular osteosarcoma: 50 cases (1999-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 232 (10). 1504-1510
- Ball, K. R., Rubin, J. E., Chirino-Trejo, M. & Dowling, P. M. (2008) Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. *The Canadian Veterinary Journal*. 49. 985-990
- Bannoehr, J., Zakour, N., Waller, A., Guardabassi, L. & Thoday, K. (2007) Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insight into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *Journal of Bacteriology*. 189 (23). 8685-8692.
- Baptista, C., Martins, L., Santos, J., Frias, C., Ribeiro, J. & Matos, A. (2008) Radiographic findings of pulmonary metastasis from canine mammary gland tumours: a two year follow-up study [abstract]. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 49 (2). 205
- Barabas, K., Milner, R., Lurie, D. & Adin, C. (2008) Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications [abstract]. *Veterinary and Comparative Oncology*. 6 (1). 1-18
- Bartges, J. W. (2005) Urinary Tract Infections. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th Ed.). (pp. 1800-1808). USA: Elsevier Saunders
- Bartges, J. W. (2007) Bacterial Urinary Tract Infections. In *Proceedings of the North American Veterinary Conference 2007*. Orlando, Florida, USA
- Bennaceur, K., Chapman, J., Touraine, J. & Portoukalian, J. (2009) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1795. 16-24.
- Beyer, M. & Schultze, J. (2006) Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 108 (3). 804-811

- Biller, B. J., Elmslie, R. E., Burnett, R. C., Avery, A. C. & Dow, S. W. (2007) Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 116. 69-78
- Birklé, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R. & Aubry, J. (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 85 (3-4). 455-463.
- Blackwood, L. (2008) Problems with chemotherapy of lymphoma – how to cope. In *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress*. Dublin, Ireland
- Boerlin, P. & White, D. G. (2006) Antimicrobial resistance and its epidemiology. In S. Giguère, Prescott, Baggot, R. D. Walker & Dowling (eds.) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (4th Ed). (pp. 27-41)
- Bonaventura, G., Spedicato, I., D'Antonio, D., Robuffo, I. & Piccolomini, R. (2004) Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazol, and ceftazidima. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (1). 151-160
- Bostock, D. E. & Curtis, R. (1984) Comparisom of canine oropharyngeal malignancy in various geographical locations [abstract]. *The Veterinary Record*. 114 (14). 341-342
- Bremers, A. J. A. & Parmiani, G. (2000) Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 34 (1). 1-25
- Bright, J. J. & Sriram, S. (1998) TGF-beta inhibits IL-12-induced activations of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. *Journal of Immunology*. 161 (4). 1772-1777.
- Brønden, L. B., Eriksen, T. & Kristensen, A. T. (2010a) Mast cell tumors and other skin neoplasia in Danish dogs – data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 52. 6
- Brønden, L. B., Nielsen, S. S., Toft, N. & Kristensen, A. T. (2010b) Data from the Danish Veterinary Cancer Registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *The Veterinary Record*. 166. 586-590
- Bronte, V., Chappell, D., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P. & Restifo, N. (1999) Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *Journal of Immunology*. 162 (10). 5728-5737.
- Bubenik, L. J., Hosgood, G. L., Waldron, D. R. & Snow, L. A. (2007) Frequency of urinary tract infection in catheterized dogs and comparison of bacterial culture and susceptibility testing results for catheterized and noncatheterized dogs with urinary tract infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 231 (6). 893-899.
- Carroll, K. C., Cohen, S., Nelson, R., Campbell, D. M., Claridge, J. D., Garrison, M. W., Kramp, J., Malone, C., Hoffmann, M. & Anderson, D. E. (1998) Comparison of various in vitro susceptibility methods for testing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 32. 229-235
- Cassali, G. D., Melo, B. M., Madureira, N., Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Ribeiro, G. M. & Campos, C. B. (2009) Mammary gland diagnosis of the laboratory of comparative

pathology – UFMG, Brazil, from 2000 to 2008. In *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009*, São Paulo, Brazil

- Cavallo, J. D., Bonnet, R., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Dabernat, H., Drugeon, H., Dubreuil, L., Guery, B., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., M.H. Nicolas-Chanoine, Plesiat, P., Quentin, C., Rouveix, B., Soussy, C. J., Varon., E. & Weber, P. (2010). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie – recommandations 2010. Société Française de Microbiologie.
- Chang, L., Chen, H., Chang, C., Lee, T. & Wu, W. (2004) Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53. 518-521
- Chen, W. & Whal, S. (2003) TGF- β : the missing link in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 14. 85-89
- Cheng, X. & Lopez, D. (1998) CD4⁺, but not CD8⁺, T cells from mammary tumor-bearing mice have a downregulated production of IFN- γ : role of phosphatidyl serine. *Journal of Immunology*. 160. 2735-2741
- Chikamatsu, K., Sakakura, K., Whiteside, T. L. & Furuya, N. (2007) Relationships between regulatory T cells and CD8⁺ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*. 29 (2). 120-127
- Chu, E. & Sartorelli, A. C. (2004) Cancer chemotherapy. In B. G. Katzung (Ed.). *Basic & Clinical Pharmacology* (9th Ed.). (pp.898-930). USA: McGraw Hill
- Chun, R. & Garret, L. (2005) Urogenital and mammary gland tumors. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th Ed.). (pp. 784-789). Missouri, USA: Elsevier Saunders
- Chun, R. (2009) Lymphoma: which chemotherapy protocol and why?. *Topics in Companion Animal Medicine*. 24 (3). 157-162
- CLSI (2006). M100-S16 – Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI.
- CLSI (2008). M31-A3 – Performance standards for antimicrobial disk diffusion and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd Edition. CLSI.
- Cohn, L. A. (2005) Glucocorticoid therapy. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th Ed.). (pp.503-508). Missouri, USA: Elsevier Saunders
- Cools, N., Van Tendeloo, V., Smits, E., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. & Ponsaerts, P. (2008) Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF- β /IL-10 double-positive CD4⁺ regulatory T cells [abstract]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 12 (2). 690-700
- Denton, M. & Kerr, K.G. (1998) Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (1). 57-80.
- Devriese, L., Hermans, K., Baele, M. & Haesebrouck, F. (2009) *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*. 133. 206-207.

- Devriese, L., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55. 1569-1573.
- Dhodapkar, M., Steinman, R., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 193 (2). 233
- DiBartola, S. P. (2005) Renal Disease: Clinical Approach and Laboratory Evaluation. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th Ed.). (pp. 1716-1730). USA: Elsevier Saunders
- Dobson, J. M. & Scase, T. J. (2007) Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 48. 424-431
- Dobson, J. M. (2003) TNM classification and clinical staging. In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (2nd Ed.). (pp. 18-20). England: BSAVA.
- Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Rose, T., Magnussen, G., Hultgren, S. J. & Waksman, G. (2001). Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesion to its human kidney receptor. *Cell*. 105. 733-743.
- Drago, L., Nicola, L., Mattina, R. & De Vecchi, E. (2010) In vitro selection of resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* at *in vivo* fluoroquinolone concentrations [versão electrónica]. *BMC Microbiology*. Acedido em Maio 30, 2010 em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-10-119.pdf>
- Elenkov, I. J. (2006) Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance [abstract]. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1024 (Glucocorticoid action: Basic and clinical implications). 138-146
- Emödy, L., Kerényi, M., Nagy, G. (2003) Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22 (2). 29-33
- Engel, D., Dobrindt, U., Tittel, A., Peters, P., Maurer, J., Gütgemann, I., Kaissling, B., Kuziel, W., Jung, S. & Kurts, C. (2006) Tumor Necrosis Factor Alpha- and Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cells Are Rapidly Recruited to the Bladder in Urinary Tract Infection but Are Dispensable for Bacterial Clearance. *Infection and Immunity*. 74 (11). 6100-6107
- Falagas, M. E., Kastoris, A. C., Vouloumanou E. K. & Dimopoulos, G. (2009) Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 28. 719-730
- Féria, M. C. (2001) Infecção do tracto urinário no cão por *Escherichia coli*: Abordagem molecular ao diagnóstico, fisiopatologia e resistência às beta-lactaminas. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa
- Fontenot, J., Gavin, M. & Rudensky, A. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [abstract]. *Nature Immunology*. 4. 330-336
- Franchimont, D. (2006) Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment

strategies [abstract]. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1024 (Glucocorticoid action: Basic and clinical implications). 124-137

Frimberger, A. E. (2005) Principles of Chemotherapy. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th Ed.). (pp.708-712). Missouri, USA: Elsevier Saunders

Gales, A. C., Jones, R. N., Forward, K. R., Liñares, J., Sader, H. S. & Verhoef, J. (2001) Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clinical Infectious Disease*. 32 (S2). 104-113

Gaschen F. P. & Teske, E. (2005) Paraneoplastic syndrome. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th Ed.). (pp. 789-795). Missouri, USA: Elsevier Saunders

Godaly, G., Proudfoot, A., Offord, R., Svanborg, C. & Agace, W. (1997) Role of Epithelial Interleukin-8 (IL-8) and Neutrophil IL-8 Receptor A in *Escherichia coli*-Induced Transuroepithelial Neutrophil Migration. *Infection and Immunity*. 68 (8). 3451-3456

Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B., Kuby, J. (2003) *Immunology* (5th Ed.) New York: W. H. Freeman and Company

Gould, S. (2003) Paraneoplastic syndromes. In . In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (2nd Ed.). (pp. 61-67) England: BSAVA

Graver, G. F. (2003) Urinary Tract Infection. In R. W. Nelson & C. G. Couto, *Small Animal Internal Medicine* (3rd Ed.) USA: Mosby

Gregori, S., Bacchetta, R., Passerini, L., Levings, M. & Roncarolo, M. (2007) Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells [abstract]. *Methods in Molecular Biology*. 380. 83-105

Gülmez, D., Çakar, A., Şener, B., Karakaya, J. & Haşçelik, G. (2010) Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing [versão electrónica]. *Journal of Infection and Chemotherapy*. Acedido em Julho 1, 2010 em: <http://www.springerlink.com/content/k354859762326u62/fulltext.pdf>

Haraoka, M., Hang, L., Frendéus, B., Godaly, G., Burdick, M., Strieter, R. & Svanborg, C. (1999) Neutrophil Recruitment and Resistance to Urinary Tract Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 180 (4). 1220-1229

Harizi, H., Juzan, M., Pitard, V., Moreau, J. & Gualde, N. (2002) Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *Journal of Immunology*. 168. 2255-2263

Hohenhaus, A. E. (2005) Cyclophosphamide: new thoughts on an old drug. In *Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference*. Orlando, Florida, USA

Hooper, D. C. (2002) Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci. *The Lancet Infectious Diseases*. 2 (9). 530-538.

- Jeglum, K. A. (2009) Canine lymphoma: gold standard for the treatment of localized and advanced stages. In *Proceedings of the International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians*. Rimini, Italy
- John, R. & Nelson, P. (2007) Dendritic cells in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 18. 2628-2635
- Johnson, J. R. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical and Microbiology Reviews*. 4 (1). 80-128
- Johnson, J. R., Kaster, N., Kuskowski, M. A. & Ling, G. V. (2003) Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from Dogs with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (1). 337-345
- Kau, A. L. Hunstad, D. A. & Hultgren S. J. (2005) Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Current Opinion in Microbiology*. 8. 54-59
- Kitchell, B. E. (2005) Practical chemotherapy – an overview. In *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association*. Mexico City, Mexico
- Kogika, M. M. (2009) Recommendations for management of urinary tract infection in dogs. In *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009*. São Paulo, Brazil
- Kosmaczewska, A., Ciszak, L., Potoczek, S. & Frydecka, I. (2008) The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 56. 181-191
- Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D. (2006) Effect on tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Review*. 25. 323-331.
- Lana S. E. (2003) Chemotherapy. In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (2nd Ed.). (pp. 86-103) England: BSAVA
- Letterio, J. J. & Roberts, A. B. (1998) Regulation of immune responses by TGF- β . *Annual Review of Immunology*. 16. 137-161.
- Liu, C., Chang, S., Narko, K., Trifan, O., Wu, M., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T. & Timothy (2001) Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (21). 18563-18569.
- Livermore, D. M., Hope, R., Brick, G., Lillie, M. & Reynolds, R. (2008) Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62 (S2). ii55-ii63
- Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. & Vries, J. E (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an auto regulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 174 (5). 1209-1220.
- Marraffini, L., DeDent, A. & Schneewind, O. (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70 (1). 192-221.

- McManus, M.C. (1997) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents [abstract]. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 54 (12). 1420 –1433.
- Medzhitov, R. (2003) The innate immune system. In William E. Paul, *Fundamental Immunology* (5th Ed.). (pp. 497-517) Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Moore, A. (2005) Practical chemotherapy. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th Ed.). (pp.713-720). Missouri, USA: Elsevier Saunders
- Moore, A. (2007) What is the best protocol for canine lymphoma?. In *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association*. Sydney, Australia
- Morais, H. A. (2009) Empiric Antibiotic Therapy. In *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009*. São Paulo, Brazil.
- Morris, J. S. (2010) Improving the diagnosis and treatment of canine mammary tumours: immunohistochemical markers as prognostic tools. *The Veterinary Journal*. 184. 3-4
- Münz, C., Steinman, R. M. & Fujii, S. (2005) Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *The Journal of Experimental Medicine*. 202 (2). 203-207.
- Murphy, S. (2003) Mast cell tumours. In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.) BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology (2nd Ed.). (pp. 161-167). England: BSAVA
- Murphy, S., Sparkes, A. H., Blunden, A. S., Brearley, M. J. & Smith K. C. (2006) Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *The Veterinary Record*. 158. 287-291
- Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of Experimental Medicine*. 194 (5). 629-644
- Newman, S. J. & Confer, A. W. & Panciera, R. J.(2007) Urinary System. In M. D. McGavin & J. F. Zachary, *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (4th Ed.) (pp. 613-691). USA: Mosby (Elsevier)
- Nicodemo, A. C., Araujo, M. R. E., Ruiz, A. S. & Gales, A. C. (2004) *In vitro* susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53. 604-608
- O'Neill, K., Guth, A., Biller, B., Elmslie, R. & Dow S. (2009) Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. *The Journal of Veterinary Internal Medicine*. 23 (4). 875-881
- Paliogianni, F., Ahuja, S. S., Balow, J. P., Balow, J. E. & Bournpas, D. T. (1993) Novel mechanism for inhibition of human T cells by glucocorticoids. *The Journal of Immunology*. 151. 4081-4089
- Pankuch, G. A., Jacobs, M. R., Rittenhouse, S. F. & Appelbaum, P. C. (1994) Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight beta-lactams (including beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations) and ciprofloxacin tested by five methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38 (10). 2317-2322

- Pascal, S., Haenni, M., Jouy, E., Kempf, I., Madec, J., Meunier, D., Morvan, H., Drugeon, H., Laurentie, M., Laval, A., Leclercq, R. & Toutain, P. (2010). Groupe de travail: antibiogramme veterinaire du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Société Française de Microbiologie.
- Paterson, D. L. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*. 119 (6). S1. S20-S28.
- Pinzon-Charry, Maxwell, T. & López, J. A. (2005) Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunology and Cell Biology*. 83. 451-461.
- Plescia, O. J., Pontieri, G. M., Brown, J., Racis, S., Ippoliti, F., Bellelli, L., Sezzi, M. L. & Lipari, M. (1984) Amplification by macrophages of prostaglandin-mediated immunosuppression in mice bearing syngeneic tumors [abstract]. *Prostaglandins, leukotrienes, and medicine*. 16 (2). 205-223
- Polzin, D. (2007) Difficult urinary tract infections. In *Proceedings of the Società Culturale Italiana Veterinari per Animali da Compagnia Congress 2007*, Rimini, Italy.
- Pomba, C. (2004) Etiologia e critérios de diagnóstico da infecção bacteriana do tracto urinário no cão. *Medicina Veterinária*. 59. 14-24
- Pomba, C., Delgado, M., Ferreira, M., Pereira, S., Baptista, B. & Correia, J. (2009) Etiology of canine and feline lower urinary tract infections and surveillance study of antimicrobial resistance in Lisbon, Portugal. In *Proceedings of the 19th Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals 2009*. Porto, Portugal
- Pomba, C., Delgado, M., Peixoto, A., Costa, M. & Correia, J. (2007) Emergence of plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamases in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. In *Proceedings of the 17th Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals*. Budapest, Hungary
- Portoukalian, J., Zwingelstein, G. & Doré, J. (1979) Lipid composition of human malignant melanoma tumours at various levels of malignant growth. *European Journal of Biochemistry*. 94. 19-23.
- Powers, B. E. (2003) Tumour pathology. In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (2nd Ed.). (pp. 10-17). England: BSAVA.
- Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. (2007) Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology*. 25. 267-296.
- Ratta, M., Fagnoni, F., Curti, A., Vescovini, R., Sansoni, P., Oliviero, B., Fogli, M., Ferri, E., Cuna, G. R., Tura, S., Baccarani, M. & Lemoli, R. (2002) Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 100 (1). 230-237.
- Rebhun, R. B. & Thamm, D. H. (2010) Multiple distinct malignancies in dogs: 53 cases [abstract]. *Journal of the American Hospital Association*. 46 (1). 20-30
- Reiman, R. A., Mauldin, G. E. & Mauldin, G. N. (2008) A comparison of toxicity of two dosing schemes for doxorubicin in the cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 10. 324-331

- Rennie, R. (2004) Antimicrobial Susceptibility Testing of *Stenotrophomonas maltophilia* [versão electrónica]. *CMPT Connections*. (pp. 2-3)
- Rinkardt, N. E., Kruth, S. A. & Kaushik, A. (1999) The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 63. 18-24
- Rosen, D. A., Pinkner, J. S., Jones, J. M., Walker, J. N., Clegg, S. & Hultgren, S. J. (2008) Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infection and Immunity*. 76 (7). 3337-3345.
- Ruscher, C., Becker, A., Wleklinski, C., Soba, A., Wieler, L. & Walther, B. (2009) Prevalence of methicilin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Veterinary Microbiology*. 136. 197-201.
- Rutteman, G. R. & Kirpensteijn, J. (2003) Tumours of the mammary glands. In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (2nd Ed.). (pp. 234-242) England: BSAVA
- Salvado, I. (2010) *Estudo retrospectivo das neoplasias em canídeos e felídeos domésticos, analisadas pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, no período entre 2000 e 2009*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa
- Schilling, J., Martin, M., Hung, C., Lorenz, R. & Hultgren, S. (2003) Toll-like receptor 4 on stromal and hematopoietic cells mediates innate resistance to uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (7). 4203-4208
- Senior, D. (2006) Urinary Tract Infection. In *Proceedings of the 31st World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2006*, Prague, Czech Republic
- Sharma, S., Stolina, M., Yang, S., Baratelli, F., Lin, J., Atianzar, K., Luo, J., Zhu, L., Lin, Y., Huang, M., Dohadwala, M., Batra, R. & Dubinett, S. (2003) Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clinical Cancer Research*. 9. 961-968.
- Shasheen, B., Wang, C., Johnson, C., Kaltenboeck, B. & Boothe D. (2009) Detection of fluoroquinolone resistance level in clinical canine and feline *Escherichia coli* pathogens using real-time PCR assay. *Veterinary Microbiology*. 138. 379-385
- Shigemura, K., Arakawa, S., Tanaka, K. & Fujisawa, M. (2009) Clinical investigation of isolated bacteria from urinary tracts of hospitalized patients and their susceptibilities to antibiotics [abstract]. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 15 (1). 18-22.
- Sietsma, I., Nijhof, W., Vellenga, E., Kamps, W. & Kok, J. (1998) Inhibition of hemopoiesis in vitro by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Research*. 58. 4840-4844.
- Siqueira, A. K., Ribeiro, M. G., Leite, D. S., Tiba, M. R., Moura, C., Lopes, M., Prestes, N., Salerno, T. & Silva, A. V. (2009) Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*. 86. 206-210.

- Sirois, M. (2007a) Urinalysis: Physical and Chemical Evaluation. In *Proceedings of the Atlantic Coast Veterinary Conference 2007*. Orlando, Florida, USA
- Sirois, M. (2007b) Urinalysis: Sample Collection and Handling. In *Proceedings of the Atlantic Coast Veterinary Conference 2007*. Orlando, Florida, USA
- Sivick, K. & Mobley, H. (2010) Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infection and Immunity*. 79 (2). 568-585.
- Sivick, K., Schaller, M., Smith, S. & Mobley, H. (2010) The innate immune response to uropathogenic *Escherichia coli* involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection. *The Journal of Immunology*. 184. 2065-2075
- Slauson, D. & Cooper, B. (2002) *Mechanisms of disease – A textbook of comparative general pathology* (3rd Ed.) USA: Mosby
- Sozzani, S. (2005) Dendritic cell trafficking: More than just chemokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 16. 581-592
- Steen, S. I. & Webb, P. J. (2007) Extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria isolated from companion animals. *The Veterinary record*. 161. 703.
- Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P., Portanova, J., Lee, J. & Dubinett, S. (2000) Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *Journal of Immunology*. 164. 361-370.
- Struve, C., Bojer, M. & Krogfelt, K. A. (2008) Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and Immunity*. 76 (9). 4055-4065.
- Szkaradkiewicz, A., Karpiński, T., Drews, M., Borejsza-Wysocki, M., Majewski, P. & Andrzejewska, E. (2010) Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF- β 1) in patients with gastric cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010.
- Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M. & Akdis, C. (2006) Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells. *Immunology*. 117. 433-432.
- Tenover, F. C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119 (6a). S3-S10.
- Thumbikat, P., Waltenbaugh, C., Schaeffer, A. J. & Klumpp, D. J. (2006) Antigen-specific responses accelerate bacterial clearance in the bladder. *The Journal of Immunology*. 176. 3080-3086.
- Tizard, I. R. (2004) *Veterinary Immunology – An Introduction* (6th Ed). (pp. 12-18, 26, 36, 49, 57-61, 136-140, 142, 143, 216). USA: Saunders.
- Torres, S. M., Diaz, S. F., Nogueira, S. A., Jessen, C., Polzin, D. J., Gilbert, S. M. & Horne, K. L. (2005) Frequency of urinary tract infection among dogs with pruritic disorders receiving long-term glucocorticoid treatment. *Journal of Veterinary Medicine Association*. 227 (2). 239-243

- Tsai, P., Breen, T. E., Lana, S. E., Nielsen, D., Motsinger-Reif, A. & Breen, M. (2009) Canine lymphoma – the prognostic significance of cytogenetic changes. In *Proceedings of the Genes, Dogs and Cancer: 5th International Canine Cancer Conference*. Orlando, Florida, USA
- Vail, D. (2003) Lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. . In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (2nd Ed.). (pp. 276-292) England: BSAVA
- Valdezate, S., Vindel, A., Loza, E., Baquero, F. & Cantón, R. (2001) Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (5). 1581-1584.
- Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A. & Mutinelli, F. (2009) Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats [versão electrónica]. *BMC Veterinary Research*. 5.
- Vila, J. & Marco, F. (2010) Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram [abstract] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. [versão electrónica]. Acedido em Julho 5, 2010 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20579775>
- Walker, M., Kasproicz, D., Gersuk, V., Bènard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J. & Ziegler, S. (2003) Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25-T cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 112 (9). 1437-1443
- Walker, R. D. & Giguère, S. (2006) Principles of antimicrobial drug selection and use. In S. Giguère, Prescott, Baggot, R. D. Walker & Dowling (eds.) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (4th Ed.). (pp. 107-113)
- Walker, R. D. (2006). Antimicrobial susceptibility testing methods and interpretation of results. In S. Giguère, Prescott, Baggot, R. D. Walker & Dowling (eds.) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (4th Ed). (pp. 11-22)
- Walker, T. M., Burger, C. J. & Elgert, K. D. (1994) Tumor growth alters T cell and macrophage production of and responsiveness to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: partial dysregulation through interleukin-10 [abstract]. *Cellular immunology*. 154 (2). 342-357
- Walter, C. U., Biller, B. J., Lana, S. E. Bachand, A. M. & Dow, S. W. (2006) Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 20. 342-347
- Wang, H. & Wang, R. (2007) Regulatory T cells and cancer. *Current Opinion in Immunology*. 19. 217-223.
- Wang, R. (2006) Immune suppression by tumor-specific CD4⁺ regulatory T-cells in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 16. 73-79
- Wang, R. (2008) CD8⁺ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Human Immunology*. 69. 811-814.
- Waters, V. J., Gómez, M. I., Soong, G., Amin, S., Ernst, R. K. & Prince, A. (2007) Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infection and Immunity*. 75 (4). 1698-1703.

- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2008) *Prescott, Harley and Klein's Microbiology* (7th Ed). New York: McGraw-Hill
- Wolf, A. M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E. & Grubeck-Loebenstien, B. (2003) Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 9 (2). 606-612
- Yang, L. & Carbone, D. (2004) Tumor-host interactions and dendritic cell dysfunction [abstract]. *Advances in Cancer Research*. 92. 13-27.
- Yang, L., Yagamata, N., Yadav, R., Brandon, S., Courtney, R., Morrow, J., Shyr, Y., Boothby, M., Joyce, S., Carbone, D. & Breyer, M. (2003) Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities by prostaglandin EP2 receptor. *The Journal of Clinical Investigation*. 111 (5). 727-735
- Zhang, L., Li, X. & Poole, K. (2000) Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (2). 287-293.
- Zheng, S., Gray, J., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S. & Horwitz, D. (2002) Generation ex vivo of TGF- β -producing regulatory cells from CD4⁺CD25⁺-precursors. *Journal of Immunology*. 169. 4183-4189

ANEXOS

ANEXO 1 – CASUÍSTICA REFERENTE AO ESTÁGIO CURRICULAR NO *BARTON VETERINARY HOSPITAL*

Tabela 29 - Descrição do número de horas de estágio em cada serviço do *Barton Veterinary Hospital*

Serviço	Total de horas
Consulta	192
Imagiologia	40
Cirurgia	108
Internamento	120

Gráfico 7 - Distribuição relativa das horas dispendidas em cada serviço do *Barton Veterinary Hospital*

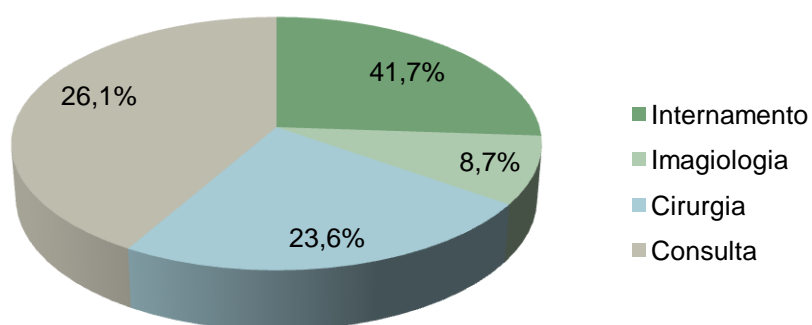


Tabela 30 – Síntese da casuística referente aos diferentes serviços durante o estágio no *Barton Veterinary Hospital*

Serviço		Procedimento / Área clínica	Espécie	N.º de casos	N.º Total de casos/ serviço
Consultas	Consulta de 1ª opinião	1ª Consulta	Gatinho	8	146
			Cachorro	10	
		Vacinação	Felídeo	11	
			Canídeo	20	
		Sistema Gastro-Intestinal	Felídeo	4	
			Canídeo	9	
		Sistema músculo-esquelético	Felídeo	3	
			Canídeo	4	
		Sistema Urinário	Felídeo	6	
			Canídeo	2	
		Sistema cardio-respiratório	Felídeo	6	
			Canídeo	3	
		Sistema Nervoso	--	0	
		Sistema Reprodutor	Canídeo	2	
		Dermatologia	Felídeo	6	
			Canídeo	9	
		Oftalmologia	Felídeo	2	
			Canídeo	9	
		Check-up animal senior	Felídeo	6	
			Canídeo	4	
		Consulta pré-cirúrgica	Felídeo	6	
			Canídeo	5	
		Vários	Espécies exóticas	11	
	Consulta de referência	Cardiologia	Felídeo	7	38
			Canídeo	8	
		Oftalmologia	Felídeo	5	
			Canídeo	6	
		Medicina Interna	Felídeo	2	
			Canídeo	2	
		Tratamento do hipertiroidismo com I ¹³¹	Felídeo	8	
Imagiologia	Radiologia	Exames radiológicos	Felídeo	5	14
			Canídeo	9	
	Ecografia	Ecografia abdominal	Felídeo	3	30
			Canídeo	6	
		Ecocardiografia	Felídeo	12	
			Canídeo	7	
		Ecografia ocular	Canídeo	2	

Tabela 30 – (Continuação)

	Endoscopia	Broncoscopia	Felídeo	4	5
			Canídeo	1	
Cirurgia	–	Ovario-histerectomia	Felídeo	14	68
			Canídeo	8	
		Orquiectomia	Felídeo	15	
			Canídeo	9	
		Laparotomia exploratória	Felídeo	1	
			Canídeo	1	
		Resolução de luxação patelar	Canídeo	1	
		Destartarização	Felídeo	8	
			Canídeo	5	
		Esplenectomia	Canídeo	2	
		Cesariana	Canídeo	2	
		Enucleação	Felídeo	1	
		Electrodepilação (distiquíase)	Canídeo	1	
Internamento	–	Preparação pré-cirúrgica	Felídeo	14	115
			Canídeo	23	
		Recobro pós-cirúrgico	Felídeo	17	
			Canídeo	22	
		Teste de estimulação ACTH	Canídeo	2	
		Quimioterapia	Felídeo	1	
			Canídeo	1	
		Assistência aos animais internados	Felídeo	21	
			Canídeo	14	

ANEXO 2 – CASUÍSTICA REFERENTE AO ESTÁGIO CURRICULAR NO HOSPITAL ESCOLAR DA FMV – UTL

Tabela 31 - Descrição do número de horas de estágio em cada serviço do Hospital Escolar da FMV - UTL

Serviço	Total de horas
Medicina Interna	232
Imagiologia	86
Cirurgia	88
Internamento	312

Gráfico 8 - Distribuição relativa das horas dispendidas em cada serviço do Hospital Escolar da FMV - UTL

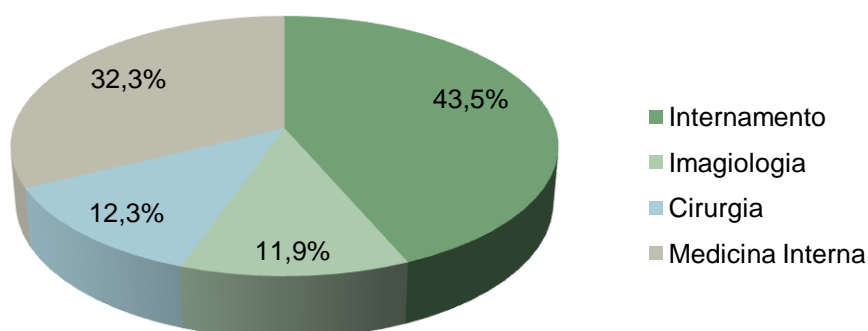


Tabela 32 - Descrição detalhada da casuística referente ao serviço de Medicina Interna durante o estágio no Hospital Escolar da FMV - UTL

Área Clínica	Espécie animal	Diagnóstico / Procedimentos	N.º de Casos	N.º Total de casos por área	% Total de casos por área
Vacinações	Canídeos	-	18	26	10,28
	Felídeos	-	8		
Sistema apendicular/ortopédico (claudicações, fracturas, etc)	Canídeos	-	14	18	7,11
	Felídeos	-	4		
Sistema Gastro-Intestinal	Canídeos	Pancreatite crónica	1	23	9,09
		Pancreatite aguda	2		
		Parasitose	3		
		Suspeita de IBD	1		
		Megaesófago	2		
		Outros	8		
	Felídeos	Diverticulite	1		
		Megacólon	1		
		Outros	4		
Sistema Cardio-Respiratório	Canídeos	IC	3	8	3,16
		Pneumonia	1		
		Infecção respiratória superior	4		
	Felídeos	Cardiomiopatia hipertrófica	1		
		Asma felina	2		
Sistema Nervoso	Canídeos	Hidrocefalia	1	9	3,56
		Outros	7		
	Felídeos	Intoxicação por permetrinas	1		
Sistema Urinário	Canídeos	IRC	9	27	10,67
		ITU	5		
	Felídeos	IRC	10		
		Outras	3		
Sistema Reprodutor	Canídeos	Piometra	3	3	1,19

Tabela 32 – (Continuação)

Oncologia	Canídeos	Suspeita de neoplasia mamária	9	27	10,67
		Suspeita de Sarcoma de Sticker	1		
		Suspeita de neoplasia testicular	4		
		Suspeita de neoplasia pulmonar	1		
		Suspeita de neoplasia da cavidade oral	2		
		Suspeita de hemangiossarcoma	2		
		Insulinoma	1		
	Felídeos	Linfoma	3		
		Suspeita de neoplasia mamária	4		
Quimioterapia	Canídeos	Linfoma	3	13	5,14
		Mastocitoma	4		
		Osteossarcoma	1		
		Glioma	1		
		Suspeita de fibrossarcoma	1		
	Felídeos	-	3		
Dermatologia	Canídeos	Otite	6	15	5,93
		Dermatite Alérgica à Picada da Pulga	2		
		Outros	5		
	Felídeos	Dermatite Alérgica à Picada da Pulga	1		
		Dermatofitose	1		
Oftalmologia	Canídeos	Distiquíase	2	8	3,16
		Úlcera da córnea	2		
		Prolapso da glândula de Harder	2		
		Uveíte	1		
		Úlcera da córnea	1		
Doenças infecciosas	Canídeos	Leishmaniose	8	22	8,70
		Dirofilariose	4		
		Piroplasmose	4		
		Parvovirose	1		
	Felídeos	PIF	3		
		FIV/FelV	2		

Tabela 32 – (Continuação)

Tratamentos e vários procedimentos	Felídeos	Remoção de pontos	2	37	14,62
		Limpeza de feridas	3		
		Punção aspirativa por agulha fina	1		
		Colheita de sangue para análises	2		
		Penso	2		
	Canídeos	Teste estimulação de ACTH	4		
		Resolução de Otopneumotoma	2		
		Colheita de sangue para análises	6		
		Punção Aspirativa por Agulha Fina	5		
		Limpeza de feridas	2		
		Remoção de pontos	4		
		Penso	3		
Traumatologia	Canídeos	Politraumatizados	3	5	1,98
		Lacerações	2		
Análises pré-cirúrgicas	Canídeos	-	8	12	4,74
	Felídeos	-	4		
Total				253	100

Tabela 33 - Casuística das intervenções cirúrgicas observadas durante o estágio realizado no Hospital Escolar da FMV - UTL

Intervenção cirúrgica	Espécie	N.º de casos	Total de casos
Destartarização	Canídeo	2	30
Mastectomia	Canídeo	5	
	Felídeo	2	
Hemimandibulectomia + Exerese de glândula salivar	Canídeo	1	
Mendibulectomia parcial	Felídeo	1	
Biópsia intestinal	Felídeo	1	
Ovariohisterectomia	Canídeo	2	
	Felídeo	3	
Piômetra	Canídeo	1	
Orquiectomia	Canídeo	3	
	Felídeo	4	
Osteossíntese do fêmur	Felídeo	1	
Remoção de placas fixadoras (ortopédicas)	Canídeo	1	
Hemilaminectomia	Canídeo	1	
Herniorrafia	Canídeo	1	
Laparotomia	Canídeo	1	

ANEXO 3 – RESULTADOS DOS INQUÉRITOS EPIDEMIOLÓGICOS REALIZADOS NO ESTUDO 1

Tabela 34 - Síntese dos resultados obtidos com os inquéritos epidemiológicos

	ON₁ (n=25)	OS₁ (n=12)	OT₁ (n=6)
Vacinado?	n=25	n=11	n=4
Desparasitado?	n=25	n=12	n=6
O seu animal fez alguma cirurgia nos últimos 6 meses?	Destartarização (n=1) Orquiectomia (n=1)	Orquiectomia (n=2) Esplenectomia (n=1) Mastectomia (n=1) Exérese de massa (n=1)	Exérese de massa (n=2)
Teve alguma ITU anteriormente?	n=0	n=1	n=0
Teve alguma alteração do tracto urinário anteriormente?	n=0	n=0	n=0
Há algum Profissional de Saúde no agregado familiar?	n=7	n=1	n=0
Há algum familiar doente que se desloque com frequência ao hospital?	n=0	n=0	n=0
O seu animal tomou algum antibiótico no último mês?	n=0	n=5	n=2
E nos últimos 3 meses?	n=2	n=0	n=0
E nos últimos 6 meses?	n=0	n=1	n=0
Sinais de ITU na última semana?	n=0	n=0	n=0
Medicação actual?	n=0	Prednisolona (n=1)	Prednisolona (n=6)